

MANEJO DE LA INFECCIÓN Y ENFERMEDAD POR  
CITOMEGALOVIRUS EN EL TRASPLANTE RENAL

IMPORTANCIA DE LA MONITORIZACIÓN  
INMUNOLÓGICA: RESPUESTA ESPECÍFICA T CD8 Y  
EXPRESIÓN DE CD94/NKG2C

MARÍA OVIDIA LÓPEZ OLIVA

mlopezo@salud.madrid.org

Facultad de Medicina - Universidad Autónoma de Madrid

2017

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Medicina por la  
Universidad Autónoma de Madrid



*“El principal objetivo de la investigación biomédica se basa en la búsqueda de causalidad entre un agente, ya sea un virus, bacteria o fármaco, y la enfermedad. Alcanzar esta meta cuando el agente sospechoso vive dentro del propio huésped es una tarea difícil. Éste es el caso del citomegalovirus”.*

*Eng-Shang Huang and Timothy F. Kowalik*



A mis padres



## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Rafael Selgas Gutiérrez, director de esta tesis, por darme la oportunidad hace nueve años de integrarme en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz y comenzar así una nueva etapa profesional en un equipo con un alto nivel científico y humano. Gracias por su confianza en mí, su incansable ánimo y su ejemplar dedicación a la investigación, pilares sin los cuales no habría sido posible realizar esta tesis.

Al doctor Carlos Jiménez Martín, director de esta tesis y compañero de trabajo durante estos años, por transmitirme el rigor científico, enseñarme la simplicidad de las cosas y mostrarme su paciencia y comprensión en los momentos difíciles.

A la doctora Teresa Bellón Heredia, directora de esta tesis, por su apoyo constante y compartir generosamente su tiempo y sus conocimientos en la realización de esta tesis.

A los doctores Fernando Escuín y Aurelio Sanz por el cuidado previo de los pacientes trasplantados de riñón y su saber hacer, que ha permitido recoger de forma uniforme la experiencia acumulada y los datos clínicos necesarios para la realización de este trabajo.

A M<sup>a</sup> José Santana, enfermera de la consulta de trasplante renal, por su excelente disponibilidad y su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

A todos mis compañeros, médicos, enfermeras y auxiliares, del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario La Paz que han colaborado en la extracción de las muestras de sangre durante estos años, por su generosa ayuda.

A Virginia Martínez y Águeda Buitrago, investigadoras de IdiPaz y al resto del equipo de investigación, por su excelente contribución en los experimentos de esta tesis.

A todos mis compañeros del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, donde realicé mi periodo de formación como nefróloga, que me

enseñaron las habilidades y conocimientos necesarios para realizar una buena praxis clínica, el respeto por los pacientes y el trabajo en equipo, así como las bases del método científico y las claves para desarrollar una investigación traslacional.

A mis amigas y compañeras de trabajo Ana Almoguera, Sara Romero, Marta Ossorio, Begoña Rivas, Cristina Vega y especialmente a Amaia Ros, por sus palabras de ánimo y su apoyo durante estos años.

A la doctora Juana Serrano, investigadora del instituto Maimónides de investigación biomédica de Córdoba, por sus aportaciones y consejos siempre acertados, por contagiarme su entusiasmo científico y acompañarme siempre.

A mis padres y hermanos por darme tanto y pedir tan poco. A Clara e Iván por el tiempo que les he podido robar en estos años y que han llenado de luz y felicidad. A toda mi familia y amigas por su ejemplar cariño que tanto me llena y siempre me acompaña.

A los pacientes, por su disponibilidad en la extracción de muestras y recogida de datos, sin los cuales no habría sido posible realizar este estudio y con el ánimo de que este trabajo pueda servirles de ayuda.



# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....</b>	<b>13</b>
<b>TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>1. - ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y TRASPLANTE RENAL .....</b>	<b>31</b>
<b>2. - CITOMEGALOVIRUS (CMV) .....</b>	<b>33</b>
Antecedentes históricos .....	33
Clasificación y descripción morfológica del CMV .....	34
Aspectos biológicos del CMV y epidemiología .....	36
<b>3. - INMUNIDAD FRENTE AL CMV .....</b>	<b>38</b>
Inmunidad innata .....	39
Macrófagos e inflamación .....	39
Células NK .....	40
Linfocitos “innatos” .....	43
Inmunidad adaptativa .....	44
Inmunidad celular frente al CMV .....	46
Inmunidad humoral frente al CMV .....	47
<b>4. - MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DEL CMV .....</b>	<b>47</b>
Mecanismos de evasión del sistema inmunológico .....	48
Mecanismos de resistencia a fármacos antivirales .....	50
<b>5. - RELACIÓN DEL CMV Y EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS). ....</b>	<b>51</b>
Epidemiología de la infección por CMV en el TOS.....	52
CMV y trasplante renal .....	53
Efectos clínicos .....	53
Estrategias de control del CMV .....	55
Monitorización virológica .....	55
Fármacos antivirales y estrategias de prevención .....	56
Monitorización inmunológica .....	58
Otras estrategias .....	60
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>65</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>
<b>1. - OBJETIVO PRINCIPAL .....</b>	<b>71</b>
<b>2. - OBJETIVOS SECUNDARIOS .....</b>	<b>71</b>
Estudio Clínico .....	71
Monitorización inmunológica.....	71
<b>PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
<b>1. – ESTUDIO RETROSPECTIVO.....</b>	<b>75</b>
Pacientes .....	75
Métodos .....	76
Análisis estadístico .....	79
<b>2. – ESTUDIO PROSPECTIVO: Con dos fases: clínica y experimental.....</b>	<b>81</b>
Pacientes .....	81
Métodos: Fase clínica .....	82

Métodos: Fase experimental .....	86
Análisis estadístico .....	90
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
<b>1. – ESTUDIO RETROSPECTIVO CLÍNICO .....</b>	<b>95</b>
Infección / enfermedad por CMV .....	95
Eventos clínicos postrasplante (efectos indirectos del CMV) .....	99
Supervivencia del paciente y predictores de mortalidad .....	99
Supervivencia del injerto y predictores de pérdida del injerto .....	104
<b>2. – ESTUDIO PROSPECTIVO.....</b>	<b>109</b>
Pacientes con terapia anticipada .....	109
Fase Clínica.....	109
Fase Experimental: Monitorización inmunológica .....	111
Pacientes con profilaxis universal .....	121
Fase clínica.....	121
Fase Experimental: Monitorización inmunológica .....	124
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>1. - Infección y enfermedad por CMV después del trasplante renal y su impacto en la supervivencia del paciente y del injerto a largo plazo. ....</b>	<b>141</b>
<b>2. - Papel de la inmunidad adaptativa en el control de la infección o enfermedad por CMV tras el trasplante renal. ....</b>	<b>145</b>
<b>3. - Papel de la inmunidad innata en el control de la infección o enfermedad por CMV tras el trasplante renal.....</b>	<b>151</b>
<b>4. - Cómo aplicar la monitorización inmunológica en la práctica clínica habitual. Propuesta de ensayo clínico .....</b>	<b>155</b>
<b>5. – Limitaciones y fortalezas .....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>193</b>
<b>Anexo 1: Artículo publicado en Nefrología .....</b>	<b>195</b>
<b>Anexo 2: Artículo publicado en Transplantation.....</b>	<b>225</b>

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



$\alpha$	alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Anti-IL2R	anticuerpos frente al receptor de la IL2
ARN	ácido ribonucleico
AUC	área bajo la curva
$\beta$	beta
BCR	receptor de la célula B, del inglés B cell receptor
BFA	brefeldina A
CMV	citomegalovirus
CD94/NKG2	receptor heterodímero lectina tipo C
$\delta$	delta
D-	donante Ig G CMV negativo
D+	donante Ig G CMV positivo
dl.	decilitro
ds	desviación estándar
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ELIsot	ensayo spot inmunoabsorbente ligado a enzimas
ERC	enfermedad renal crónica
et al.	y otros

FDA	administración americana de fármacos y alimentos, del inglés food and drug administration
FCS	suero fetal bovino, del inglés fetal calf serum
$\gamma$	gamma
gB	glicoproteína B del CMV
gH	glicoproteína H del CMV
gr.	gramos
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana, del inglés human immunodeficiency virus
HLA	antígeno leucocitario humano, del inglés human leukocyte antigen
HR	hazard ratio
HTA	hipertensión arterial
IC	intervalo de confianza
IE-1	proteína 1 inmediata precoz del CMV, del inglés immediate early 1 protein
IFN	interferón
IL	interleuquina
IMC	índice de masa corporal
IRC	insuficiencia renal crónica
IRL	secuencia repetida interna larga, del inglés internal repeat long



IRS	secuencia repetida interna corta, del inglés internal repeat short
iv.	por vía intravenosa
KIR	receptores tipo inmunoglobulina, del inglés killer cell Ig like receptors
LT-CD4	linfocito T colaborador
LT-CD8	linfocito T citotóxico
mg.	miligramos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés major histocompatibility complex
miARN	micro ARN
MIC-A	gen A relacionado con la cadena clase I del MHC, del inglés MHC class I chain related gene A
MIC-B	gen B relacionado con la cadena clase I del MHC, del inglés MHC class I chain related gene B
MF59	adyuvante inmunológico
MMF	micofenolato de mofetilo, del inglés mycophenolate mofetil
mTOR	diana de rapamicina en células de mamíferos, del inglés mammalian target of rapamycin
mTOR-C1	complejo 1 de mTOR
NCR	receptores de citotoxicidad natural de las células NKs, del inglés natural cytotoxicity receptors

NK	citolítico natural, del inglés natural killer
nm.	nanómetro
no R	no replicación postrasplante de CMV
OKT3	muromonab CD3
PBMCs	células mononucleares de sangre periférica, del inglés peripheral blood mononuclear cells
PBS	buffer fosfato salino, del inglés phosphate buffered saline
PCR-CMV	reacción en cadena de la polimerasa para citomegalovirus, carga viral de CMV en sangre
pp65	fosfolipoproteína 65 del CMV, del inglés phosphate protein 65
PRA	anticuerpos reactivos frente a panel, del inglés panel reactive antibody
PU	profilaxis universal
R-	receptor Ig G CMV negativo
R+	receptor Ig G CMV positivo
RFI	retraso en la función inicial del injerto
RIC	rango intercuartílico
R no R	replicación de CMV postrasplante clínicamente no relevante
ROC	característica operativa del receptor, del inglés receiver operating characteristic

RPMI	medio celular de la institución Roswell Park, del inglés Roswell Park Memorial Institute
RR	replicación de CMV postrasplante clínicamente relevante
TA	terapia anticipada
TB	tuberculosis
TCR	receptor de la célula T, del inglés T cell receptor
T- $\gamma\delta$	células T gamma-delta
TLR	receptores tipo toll
TNF	factor de necrosis tumoral, del inglés tumoral necrosis factor
TRL	secuencia repetida terminal larga, del inglés terminal repeat long
TRS	secuencia repetida terminal corta, del inglés terminal repeat short
Tx	trasplante
UL	región única larga, del inglés unique long
US	región única corta, del inglés unique short
ULBP	del inglés UL binding protein
x	media



## **TABLAS Y FIGURAS**



Figura 1: Células infectadas por CMV .....	33
Tabla 1: Clasificación de los herpesvirus .....	34
Figura 2: Representación esquemática del CMV .....	35
Figura 3: Esquema del genoma del CMV y cascada de expresión génica .....	37
Figura 4: Mecanismos de inmunoevasión innata promovidos por el CMV en las células infectadas .....	49
Figura 5: Esquema de activación de los antivirales.....	51
Tabla 2: Factores que contribuyen al estado neto de inmunosupresión.....	53
Figura 6: Métodos específicos de CMV para la determinación de la inmunidad celular específica .....	59
Tabla 3: Métodos analíticos específicos de la respuesta mediada por los linfocitos T frente al CMV.....	60
Figura 7: Características de los distintos preparados de vacunas .....	61
Figura 8: Mecanismos del efecto anti-CMV de los inhibidores mTOR.....	64
Figura 9: Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio retrospectivo según la estrategia de prevención. ....	75
Figura 10: Distribución de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo según la estrategia de prevención utilizada.....	81
Figura 11: Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio prospectivo según la estrategia de prevención y la presencia de infección o enfermedad por CMV ..	83
Tabla 4: Características demográficas de los receptores seropositivos que recibieron terapia anticipada.....	85
Tabla 5: Características demográficas de los receptores seronegativos y seropositivos que recibieron profilaxis universal. ....	86
Figura 12: Preparación y estimulación de las células mononucleares de sangre periférica .....	88

Figura 13: Estrategia para el análisis de subpoblaciones de leucocitos mediante citometría de flujo.....	90
Tabla 6: Características demográficas de los receptores según la replicación viral postrasplante.....	95
Tabla 7: Características demográficas de los donantes y datos peri-trasplante según la replicación viral postrasplante.....	96
Tabla 8: Incidencia acumulada, en el primer año, de infección y enfermedad por CMV .....	97
Tabla 9: Análisis de factores de riesgo de infección/enfermedad por CMV.....	98
Figura 14: Supervivencia del paciente según la replicación viral postrasplante .....	100
Figura 15: Supervivencia del paciente según la replicación viral postrasplante y la estrategia de prevención para el CMV utilizada.....	101
Tabla 10 – Modelo 1: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable agregada.....	102
Tabla 11 – Modelo 2: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable desagregada.	103
Figura 16: Supervivencia del injerto según la replicación viral postrasplante.....	104
Figura 17: Supervivencia del injerto según la replicación viral postrasplante y la estrategia de prevención para el CMV utilizada.....	105
Tabla 12 – Modelo 1: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable agregada.....	106
Tabla 13 – Modelo 2: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable desagregada.	107
Tabla 14: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes seropositivos según la replicación viral postrasplante.....	110
Tabla 15: Función renal y supervivencia del paciente y del injerto en pacientes seropositivos según la replicación viral postrasplante.....	111



Figura 18: Análisis de la producción de IFN- $\gamma$ mediante citometría de flujo intracelular en células T CD3+CD8+ y CD3+CD4+ de un individuo seronegativo y de dos muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos para CMV..	112
Figura 19: Respuesta celular T frente al antígeno viral IE-1 en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anti-IL2R.	113
Figura 20: Respuesta celular T frente al antígeno viral pp65 en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anti-IL2R	114
Figura 21: Evolución a lo largo del primer año postrasplante de la respuesta celular T frente a IE-1 y pp65 en pacientes seropositivos que recibieron terapia anticipada	115
Figura 22: Análisis con curvas ROC de las células T específicas frente a IE-1 y pp65 en muestras pre-trasplante de pacientes con o sin infección por CMV postrasplante.	116
Figura 23: Porcentaje de linfocitos T y NKs que expresan el receptor activador CD94/NKG2C en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con basiliximab, en función de la replicación viral post-trasplante.	117
Figura 24: Evolución a lo largo del primer año postrasplante de la frecuencia de células NK que expresan el receptor activador CD94/NKG2C en pacientes seropositivos en función de la replicación viral post-trasplante.	118
Figura 25: Porcentaje de linfocitos T y NKs que expresan el receptor inhibidor CD94/NKG2A en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anti-IL2R, en función de la replicación viral post-trasplante..	119
Figura 26: Media de expresión del receptor NKG2D en linfocitos T y NKs en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con basiliximab, en función de la presencia o ausencia de replicación viral post-trasplante.....	120

Tabla 16: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes <b>seropositivos</b> que recibieron profilaxis universal según la presencia de replicación viral.....	122
Tabla 17: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes <b>seronegativos</b> que recibieron profilaxis universal según la presencia de replicación viral.....	123
Tabla 18: Función renal y supervivencia del paciente y del injerto en pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron profilaxis universal según la replicación viral.....	123
Figura 27: Análisis de la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos pp65 e IE-1 en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos y seronegativos.....	124
Figura 28: Comparación de la respuesta T CD8 y CD4 pre-trasplante frente a los antígenos virales IE-1 y pp65 en pacientes seropositivos. ....	125
Figura 29: Comparación de la respuesta celular T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos en función de la presencia o ausencia de replicación viral. ....	126
Figura 30: Comparación de la respuesta T CD8 al antígeno viral IE-1 en muestras pretrasplante de pacientes seronegativos en función de la presencia o ausencia de replicación viral. ....	127
Figura 31: Análisis longitudinal de la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 durante los dos primeros años postrasplante de pacientes seropositivos en función de la presencia o ausencia de replicación viral.....	128
Figura 32: Porcentaje de linfocitos T y NK que expresan el receptor CD94/NKG2C en muestras pre-trasplante, en función del estatus serológico para CMV.....	129
Figura 33: Análisis, en muestras pre-trasplante, de la expresión del receptor CD94/NKG2C en células T y NK de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante. ....	130
Figura 34: Evolución de la expresión del receptor activador CD94/NKG2C en linfocitos T y células NK de pacientes seronegativos y seropositivos para CMV, en muestras pre-trasplante, en el momento de la replicación viral y un año post-trasplante. ..	131

Figura 35: Porcentaje de células T y NK que expresan el receptor CD94/NKG2A en muestras pre-trasplante, en función del estatus serológico para CMV.....	132
Figura 36: Análisis, en muestras pre-trasplante, de la expresión del receptor CD94/NKG2A en células T y NK de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante .....	133
Figura 37: Evolución durante los dos primeros años de la expresión del receptor CD94/NKG2A en células NKs de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios.....	134
Figura 38: Intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T y células NK en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos y seronegativos.....	135
Figura 39: Intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T y células NK en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante.. .....	135
Figura 40: Evolución de la intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T y células NK de pacientes seronegativos y seropositivos a lo largo del primer año postrasplante .....	136
Figura 41: Diseño de ensayo clínico .....	159



# INTRODUCCIÓN



## 1. - ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y TRASPLANTE RENAL

La enfermedad renal crónica se produce por la existencia de un daño estructural grave que ocasiona una disminución crónica del filtrado glomerular. Las causas de insuficiencia renal crónica (IRC) son múltiples y varían en función de factores cronológicos y geográficos<sup>1</sup>.

La IRC se caracteriza por la progresión hacia estadios avanzados de enfermedad renal, por su asociación con la enfermedad cardiovascular y por un incremento de la mortalidad<sup>2</sup>. El manejo clínico de estos pacientes se basa fundamentalmente en intentar frenar dicha progresión y reducir los factores de riesgo cardiovascular<sup>3,4</sup>. La hipertensión arterial no controlada y la proteinuria son los principales factores de progresión y son el foco sobre el que se basa el tratamiento, aunque pueden existir otros factores implicados que requieran de terapias específicas, como en el caso de pacientes con enfermedades autoinmunes que se benefician de terapias inmunosupresoras<sup>5</sup>. Sin embargo, a pesar de estos cuidados muchos pacientes desarrollan IRC avanzada y requieren del inicio de tratamiento renal sustitutivo.

De forma global, el trasplante renal es, de las opciones de terapia renal sustitutiva disponibles a día de hoy, la mejor opción para los pacientes con IRC avanzada. Datos procedentes de estudios observacionales<sup>6</sup> y de registros nacionales e internacionales<sup>7,8</sup> han demostrado la superioridad del trasplante con respecto a la hemodiálisis y a la diálisis peritoneal en relación con la supervivencia del paciente y la calidad de vida, tanto cuando el trasplante se realiza con un donante ideal como cuando se realiza con un donante con criterios expandidos<sup>9</sup>. Estos datos quedaron respaldados en una revisión sistemática por Tonelli *et al.* donde resumen de una forma clara, los beneficios del trasplante comparado con las distintas modalidades de diálisis, en estudios realizados en diferentes países y con diferentes sistemas sanitarios,

concluyendo que el trasplante renal se asocia con una reducción de la mortalidad y de los eventos cardiovasculares así como con una mejor calidad de vida comparado con la diálisis crónica<sup>10</sup>.

Todo ello justifica los esfuerzos que se realizan por aumentar el número de pacientes con IRC avanzada que se beneficiarían de un trasplante renal y los esfuerzos por prolongar la supervivencia de los pacientes una vez trasplantados.

El éxito del trasplante se basa en la necesidad crónica de un tratamiento inmunosupresor que previene el rechazo del órgano pero que aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular, infecciones y neoplasias.

Los resultados a corto plazo de los pacientes que reciben un injerto renal son excelentes, sin embargo no se han acompañado de una mejora paralela a medio y largo plazo<sup>11</sup>. Las razones que pueden explicar esta disociación se deben a la presencia de fenómenos inmunológicos y no inmunológicos sobre el injerto y a la interacción entre una gran comorbilidad cardiovascular y la aparición de infecciones y neoplasias que pueden acontecer después del trasplante, que conllevan un incremento de la mortalidad y de la pérdida del injerto. Estrategias dirigidas a reducir los factores de riesgo cardiovascular y a prevenir infecciones y tumores serían prioritarias para poder optar a una mejora en los resultados a largo plazo en el trasplante renal<sup>12</sup>. En este sentido el control de los factores de riesgo cardiovascular, el uso de fármacos inmunosupresores no nefrotóxicos, el uso de métodos de *screening* de neoplasias, el empleo de una inmunosupresión individualizada y el uso de estrategias de prevención y la mejora en el manejo de infecciones como la infección por CMV, podrían ayudar a conseguir dicho propósito.



## 2. - CITOMEGALOVIRUS (CMV)

### Antecedentes históricos

La primera descripción de los signos citopatológicos patognomónicos de la infección por CMV fue realizada por Ribbert<sup>13</sup> y por Jesionek y Kiolemenoglou<sup>14</sup> en 1904 en células de la glándula parótida, células tubulares renales, células pulmonares y células hepáticas en autopsias de dos niños (Fig. 1).

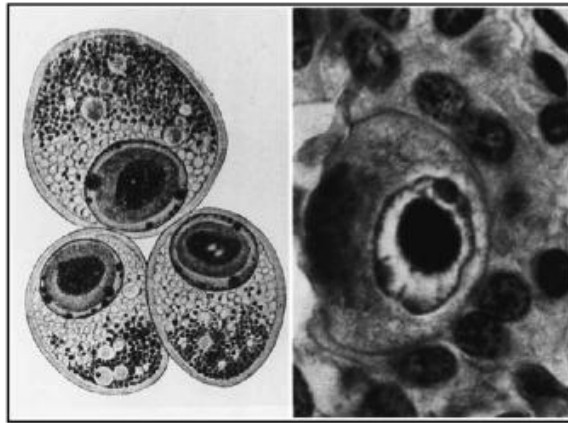


Figura 1: Células infectadas por CMV: células agrandadas con cuerpo de inclusión intranuclear rodeado por un halo<sup>15</sup>.

Originalmente, estas células citomegálicas fueron descritas erróneamente como células parecidas a los protozoos. En el año 1925 se propuso el origen viral de la enfermedad por Von Glahn y Pappenheimer<sup>16</sup> cuando descubrieron estas células agrandadas y con cuerpos de inclusión intranucleares en lesiones de un paciente infectado por el virus herpes zoster y por el virus herpes genital, poniendo en duda que estas células estuvieran relacionadas con los protozoos.

El aislamiento del virus se produjo de forma simultánea por tres grupos independientes liderados por M. Smith<sup>17</sup>, T. Weller<sup>18</sup> y W. Rowe<sup>19</sup> en el año 1956. El virus fue aislado de las glándulas salivales y fue nombrado como “citomegalovirus” por T. Weller para reemplazar al término de “virus de la glándula salival” o “virus de la

enfermedad de la inclusión citoplasmática”. En 1965 se documentó la primera descripción de la enfermedad por CMV en un adulto sano bajo la forma clínica de mononucleosis infecciosa<sup>20</sup> y en ese mismo año se aisló por primera vez el virus en un paciente trasplantado renal<sup>21</sup>.

### Clasificación y descripción morfológica del CMV

El CMV humano es un virus de la familia Herpesviridae. Se conocen más de cien especies de herpesvirus en el reino animal, de las que solamente ocho especies son capaces de producir infección en el humano. Los ocho herpesvirus humanos conocidos se clasifican en tres subfamilias de acuerdo con su genoma y comportamiento biológico (Tabla 1). El CMV pertenece a la subfamilia de los Betaherpesvirinae<sup>22</sup>.

Tabla 1: Clasificación de los herpesvirus que causan infección en el humano (modificado de Jeffrey I. Cohen. Introducción a los Herpesviridae<sup>22</sup>)

Subfamilia	Nombre común	Otra denominación	Tamaño del genoma (kbpxx10 <sup>6</sup> )
Alphaherpesvirinae	Herpesvirus humano tipo 1	Virus del herpes simple tipo 1	152
	Herpesvirus humano tipo 2	Virus del herpes simple tipo 2	152
	Herpesvirus humano tipo 3	Virus de la Varicela Zoster	125
Betaherpesvirinae	Herpesvirus humano tipo 5	Citomegalovirus	230
	Herpesvirus humano tipo 6	-	165
	Herpesvirus humano tipo 7	-	145
Gammaherpesvirinae	Herpesvirus humano tipo 4	Virus del herpes humano tipo 4	172
	Herpesvirus humano tipo 8	Herpes virus del sarcoma de kaposi	165

Todos los herpesvirus son morfológicamente similares y se componen de cuatro elementos: envoltura externa, tegumento, nucleocápside y core o núcleo interno. La envoltura está formada por porciones de las membranas celulares del huésped. El tegumento es un ensamblaje amorfo de proteínas virales, entre las que se encuentra la fosfoproteína 65 (pp65), que por un lado ayudan a iniciar el proceso replicativo y por

otro lado sirven de unión entre la envoltura y la nucleocápside. La nucleocápside está formado por 162 capsómeros y en su interior se encuentra el núcleo interno formado por proteínas virales, entre las que se encuentra la proteína inmediata-precoz 1 (IE-1), y el ácido dextrirribonucleico (ADN) viral, que es una molécula lineal y de doble cadena<sup>23</sup> (Fig 2).

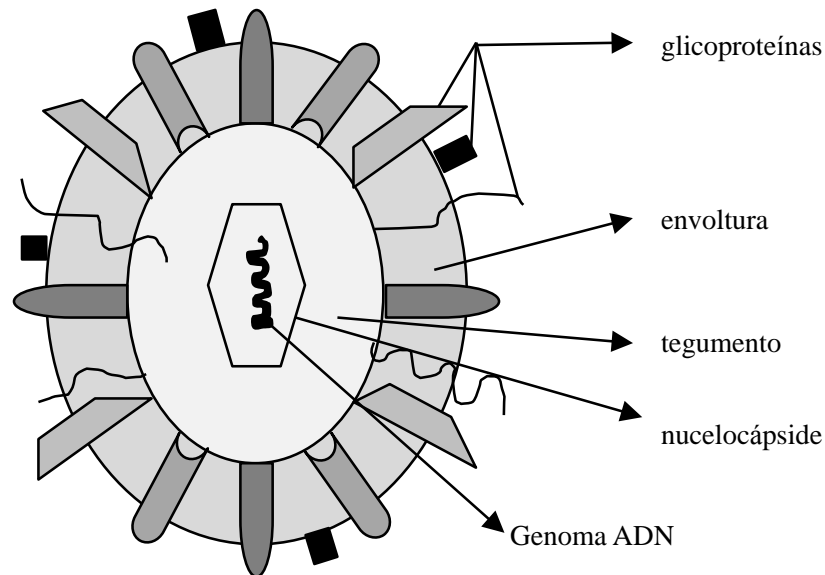


Figura 2: Representación esquemática del CMV con una composición similar al resto de virus herpes (modificada de Brennan DC, JASN 2001)<sup>21</sup>.

El CMV es el más grande de los herpesvirus y de los virus conocidos que infectan al humano. Tiene un tamaño de 150 nanómetros (nm) y un genoma con aproximadamente 235.000 pares de bases que están organizadas en un conjunto de 45 genes esenciales los cuales regulan la expresión de 230 proteínas<sup>24</sup>. El genoma se divide en 2 regiones únicas denominadas “unique long” (UL) y “unique short” (US), cada una de las cuales está flanqueada por una secuencia repetida terminal larga y corta (TRL: terminal repeat-long y TRS: terminal repeat-short, de sus siglas en inglés), y por una secuencia repetida interna larga y corta (IRL: internal repeat-long e IRS: internal repeat-

short, de sus siglas en inglés). Estas regiones contienen prácticamente todos los genes del CMV<sup>25</sup>.

### Aspectos biológicos del CMV y epidemiología

El CMV replica dentro de la célula y utiliza la maquinaria celular para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas virales que le permiten por un lado, producir infección y diseminarse, y por otro lado establecer latencia en el huésped. La infección se inicia cuando una partícula viral penetra en la célula por endocitosis. Una vez internalizado el virus, se liberan la nucleocápside y las proteínas del tegumento. La nucleocápside se transporta hacia el núcleo, se libera el ADN viral y se pone en marcha el proceso replicativo que termina con la lisis de la célula infectada y la diseminación de las nuevas partículas virales listas para infectar otras células. Este proceso se conoce como infección lítica y su activación produce la aparición de enfermedad sintomática en el huésped<sup>23</sup>.

El ciclo de replicación viral se divide a nivel génico en tres etapas<sup>25</sup>:

- Inmediata precoz: Ocurre en las cuatro primeras horas posteriores a la infección. Se sintetizan las proteínas virales alfa ( $\alpha$ ) que toman el control de la maquinaria celular y que regulan la expresión de los genes virales. En esta etapa intervienen enzimas celulares, como las ácido ribonucleico (ARN) polimerasas celulares.
- Precoz: Ocurre a continuación de la fase anterior. Se sintetizan proteínas beta ( $\beta$ ) con función reguladora de la replicación del ADN.
- Tardía: Ocurre 24 horas posteriores a la infección. Se sintetizan proteínas gamma ( $\gamma$ ) relacionadas con el ensamblaje de la envoltura viral y proteínas estructurales. (Fig. 3).

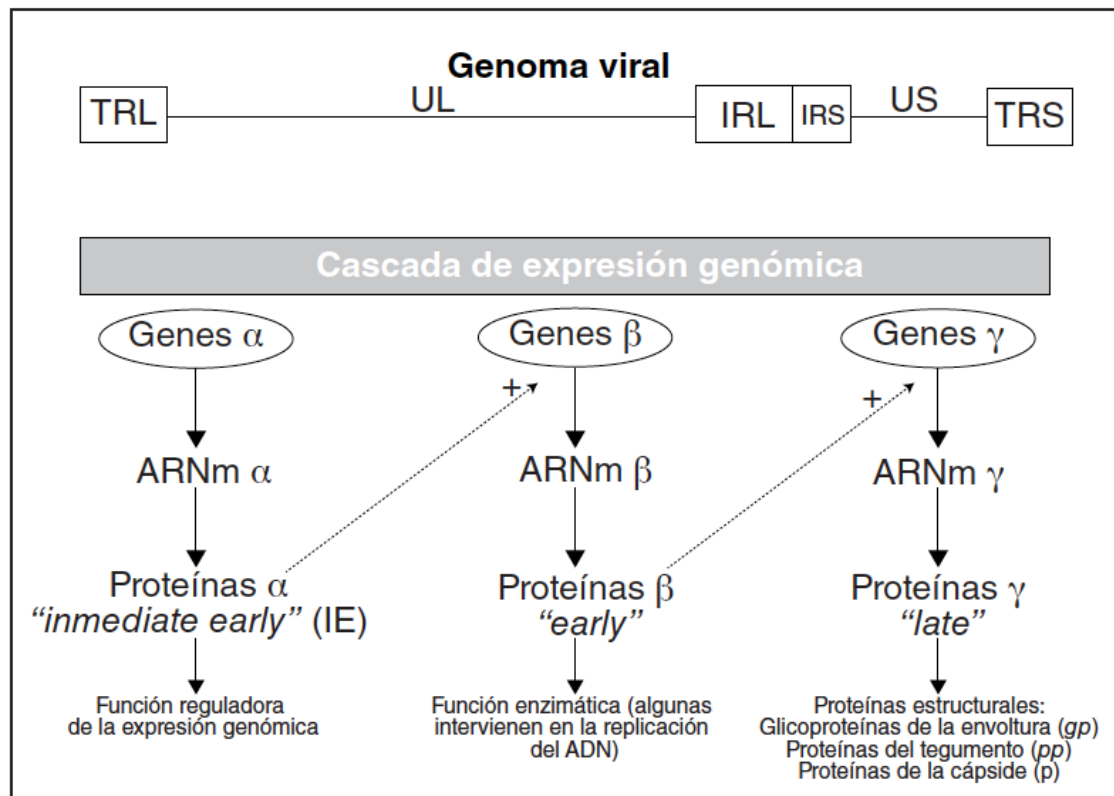


Figura 3: Esquema del genoma del CMV y cascada de expresión génica. IRL: "internal repeat long"; IRS: "internal repeat short"; p: proteínas; pp: fosfoproteínas; TRL: "terminal repeat-long", TRS: "terminal repeat-short"; UL: "unique long"; UR: "unique short" <sup>25</sup>.

La infección persistente en el huésped se conoce también como estado de latencia y es otra de las características del CMV. El éxito de la latencia se basa en la capacidad del virus para hacer que la célula infectada no sea reconocida por el sistema inmune y mantenerla viable para la producción de proteínas virales. Los mecanismos que utiliza el virus para mantenerse de por vida en el huésped no se conocen completamente, pero estudios recientes lo relacionan con la producción de micro ARN (miARN) que protegen al virus frente al proceso de muerte celular programada de las células que infectan<sup>26</sup>. El virus queda latente en monocitos, macrófagos y linfocitos T y posiblemente también en otros órganos y tejidos<sup>23</sup>.

La infección por CMV tiene una alta prevalencia mundial, especialmente en países subdesarrollados donde alcanza al 90% de la población frente al 60% de la

población en países desarrollados. El hacinamiento y la falta de higiene favorecen la transmisión del virus. En los países desarrollados, el 40% de los adolescentes son seropositivos, aumentando la prevalencia aproximadamente un 1% por año de vida<sup>27</sup>.

El CMV se excreta de múltiples sitios: saliva, orina, secreciones vaginales, semen y leche materna. La infección primaria se origina típicamente en las células epiteliales de las mucosas del aparato genitourinario, tracto respiratorio y tracto digestivo superior y se produce por contacto directo con estos fluidos de una persona infectada o a través de diseminación hematógena en el caso de la infección en recién nacidos<sup>28</sup>.

La infección por CMV se presenta de forma variable, desde la ausencia de enfermedad en los individuos sanos hasta el síndrome congénito del CMV en los recién nacidos, que suele ser mortal, y el síndrome de mononucleosis infecciosa en los adultos jóvenes. En los individuos inmunosuprimidos, como los pacientes trasplantados de órganos y tejidos y los pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), produce los síndromes más significativos y puede presentarse como infección asintomática o enfermedad<sup>23</sup>.

### **3. - INMUNIDAD FRENTE AL CMV**

Tras la infección primaria, el sistema inmunológico del huésped reacciona generando una respuesta inmune innata y adaptativa que habitualmente controla la replicación viral pero que no es suficiente para prevenir el establecimiento de latencia. Ambas respuestas inmunes actúan de forma sinérgica y complementaria. Hay evidencias de que alteraciones de los componentes de uno u otro sistema pueden predisponer a un mayor riesgo de infección por CMV<sup>29</sup>.

## Inmunidad innata

La inmunidad innata y sus elementos son los primeros que actúan frente a las infecciones y se ponen en marcha a las pocas horas de la infección<sup>30</sup>. Los componentes de este sistema se pueden dividir en barreras epiteliales, células y proteínas circulantes. La piel y las mucosas del aparato respiratorio y digestivo constituyen las barreras epiteliales. Actúan como un escudo de protección física y química, y en el caso de las mucosas sintetizan proteínas antimicrobianas que impiden la entrada de los agentes patógenos. Si estas barreras son superadas por el virus entran en juego los otros componentes del sistema inmune innato: las células y las proteínas circulantes. Las células que forman parte del sistema innato son: los macrófagos, granulocitos, células dendríticas, células natural killer (NK), células T gamma-delta (T- $\gamma\delta$ ) y células NKT. Se encargan de fagocitar y destruir los agentes patógenos, iniciar el proceso de inflamación y activar al sistema inmune adaptativo. Las proteínas del complemento, son proteínas solubles sintetizadas mayoritariamente en el hígado que intervienen en la eliminación de los agentes patógenos mediante opsonización y destrucción por parte de las células fagocíticas. Las proteínas del sistema de la coagulación se activan tras la existencia de daño vascular dando lugar a la formación de trombos de fibrina cuyo papel en la infección es el de evitar la diseminación hematógica<sup>31,32</sup>.

## Macrófagos e inflamación

Los macrófagos son células de estirpe mieloide que residen en los tejidos y son la forma madura de los monocitos, los cuales circulan por sangre periférica. Desarrollan varias funciones en la respuesta inmune; por un lado actúan como células fagocíticas destruyendo agentes patógenos, inician el proceso inflamatorio mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas y funcionan como células “limpiadoras” aclarando los detritus celulares<sup>31</sup>.

La producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias por los macrófagos permite el reclutamiento hacia los lugares de la infección de otras células del sistema inmune, como granulocitos y monocitos, que ayudan en el proceso de destrucción de las partículas virales y de las células infectadas, e incrementa el flujo linfático de las células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos cercanos, que ponen en marcha la activación de los linfocitos T específicos de antígeno iniciando la respuesta inmune adaptativa<sup>31</sup>.

El proceso inflamatorio en la infección por CMV está mediado por el reconocimiento de las glicoproteínas de superficie virales B y H (gB y gH) a través de receptores de la familia Toll-like (TLR), en concreto TLR-2, en la superficie de los macrófagos<sup>33,34</sup>. Este reconocimiento conduce a la activación de una serie de señales intracelulares que liberan interferón tipo 1 (IFN  $\alpha/\beta$ ), interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) promoviendo un ambiente antiviral. La alteración en los receptores TLR da lugar a un déficit de producción de citoquinas y se ha asociado con un mayor riesgo de infección por CMV<sup>35</sup>.

### **Células NK**

Las células NK representan del 5 al 20% de las células mononucleares periféricas y derivan de células progenitoras de estirpe linfoide, el mismo precursor que el de los linfocitos T y B<sup>31,36</sup>. Participan activamente en la defensa frente a las infecciones virales, en la vigilancia tumoral y en la generación de la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de citoquinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ ). Producen la muerte celular de las células diana a través de la liberación de gránulos citotóxicos: granzima y perforina, de forma similar a como lo hacen los linfocitos T, sin embargo difieren en la naturaleza de los receptores que provocan su activación<sup>32,36</sup>. Las células NK se caracterizan por expresar receptores activadores e inhibidores en su membrana



celular los cuales regulan su actividad. Los receptores activadores estimulan a la célula NK para destruir células infectadas y los receptores inhibidores impiden que la célula NK destruya células normales del individuo. La mayor parte de las células del organismo expresan en su superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés) de clase I. Estas moléculas son reconocidas por los receptores inhibidores de las células NK impidiendo la destrucción de células propias.

Las células que son infectadas por virus disminuyen la expresión de estas moléculas del MHC de clase I para evadirse de los linfocitos T, sin embargo se hacen visibles a las células NK, las cuales pierden el estímulo inhibitorio que les confiere la molécula MHC clase I, activándose los receptores activadores que conducen a la lisis celular<sup>32,37-39</sup>.

Estos receptores, activadores e inhibidores, se pueden dividir en dos grandes familias<sup>40</sup>:

1.- Receptores inmunoglobulina-like (“Ig-like receptors”, de sus siglas en inglés) que incluyen a:

1.A.- Receptores conocidos como KIRs (“killer cell Ig-like receptors”, de sus siglas en inglés) que se componen de 2 o 3 dominios extracelulares y 1 dominio intracelular corto o largo. El dominio intracelular les confiere su naturaleza activadora o inhibidora en función de la presencia o ausencia de determinadas proteínas acopladas. El dominio citoplasmático corto se comporta como un receptor activador y el dominio largo como un receptor inhibidor. El ligando de estos receptores son las moléculas del MHC clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C<sup>32</sup>.

1.B.- Receptores de citotoxicidad natural de las células NK (NCR, de sus siglas en inglés), que son sólo activadores y se conocen como NKp30, NKp44 y NKp46. Sus ligandos no están bien definidos<sup>32</sup>.

2.- Receptores lectina tipo C (“Type C lectyn-like receptors”, de sus siglas en inglés). Se expresan como un heterodímero de dos lectinas tipo C denominadas CD94 y NKG2. Estos receptores también pueden ser activadores o inhibidores en función de las moléculas a las que están asociadas en su vertiente intracitoplasmática. Existen cinco familias de receptores NKG2: A, B, C, D y E. Los receptores NKG2A y NKG2B son inhibidores mientras que los NKG2C, NKG2D y NKG2E son activadores. El ligando con el que interactúan estos receptores es la molécula no polimórfica del MHC de clase I: HLA-E, excepto la familia NKG2D que se une a otra clase diferente de ligandos, que son las moléculas MIC-A y MIC-B y la familia ULBP. Estos ligandos que reconoce el receptor NKG2D se expresan en las células infectadas por virus en respuesta al estrés celular o metabólico que padecen. El receptor NKG2D no sólo se expresa en células NK sino que también es expresado por células T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) y linfocitos T ( $\alpha\beta$ ) CD8<sup>32</sup>.

Una de las características que hacen especiales a las células NK es que cada célula NK expresa un repertorio de receptores activadores e inhibidores de forma aleatoria, de tal forma que no son idénticas. Además hay una fracción significativa de células NK que no expresan ningún receptor KIR. Esto hace que la regulación de la actividad de las NK sea complejo y que el comportamiento de la célula NK frente a la célula infectada dependa del balance de receptores activadores e inhibidores que exprese<sup>40-43</sup>.

El CMV es capaz de controlar la activación de las células NK a través de la generación de señales inhibitorias y la supresión de señales activadoras, haciendo que las células NK sean disfuncionantes y favoreciendo la replicación viral<sup>42</sup>. Pacientes con defectos en las células NK tienen mayor riesgo de enfermedad por CMV recurrente<sup>44,45</sup> y pacientes trasplantados con mayor número de células NK, mayor expresión de receptores KIR activadores y menor número de receptores inhibidores en las células NK presentan menor riesgo de infección por CMV<sup>46-51</sup>.

### Linfocitos “innatos”

Existen subpoblaciones linfocitarias que mantienen algunas características de los linfocitos T, como es la expresión de receptores frente a antígenos, pero presentan otras peculiaridades que las hacen comportarse como elementos del sistema inmune innato. Estas células se denominan “innate-like” o linfocitos innatos y se caracterizan por la expresión de receptores con variabilidad limitada, tienen una localización específica en el organismo y no se expanden clonalmente para el reconocimiento<sup>32</sup>.

Un tipo de linfocitos innatos son las células T- $\gamma\delta$ . Representan un porcentaje bajo del global de linfocitos T en la sangre (menos del 6%) y residen en los epitelios, fundamentalmente en la piel. Estas células se caracterizan por la expresión del receptor T, compuesto por una cadena  $\gamma$  y otra  $\delta$ . Estas células no reconocen antígenos presentados por las moléculas del MHC clase I sino que reconocen directamente a las células infectadas a través de ligandos expresados en su superficie. Su activación desencadena funciones efectoras caracterizadas por la liberación de IFN- $\gamma$  y liberación de granzima y perforina que producen la lisis celular<sup>32,52,53</sup>. Su implicación en la respuesta inmune frente al CMV se ha demostrado en varios estudios, de forma que la expansión de esta subpoblación linfocitaria se ha asociado con resolución de la

infección por CMV en pacientes trasplantados de médula ósea y de riñón<sup>54,55</sup> y la ausencia de expansión se ha asociado con enfermedad por CMV recurrente.

Otro de los tipos de linfocitos innatos son las células NKT. Se encuentran en el timo y en órganos linfoides periféricos. Expresan el receptor T compuesto por una cadena  $\alpha$  pareada con una cadena  $\beta$  con un reordenamiento único de la cadena  $\alpha$  que en humanos es V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18, asociado a una cadena V $\beta$ 11. Reconocen glicolípidos presentados por la molécula CD1d y tras el reconocimiento se caracterizan por una rápida secreción de citoquinas: IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ <sup>32</sup>.

### **Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa requiere más tiempo para ponerse en marcha y se desarrolla pasadas horas o días de la infección. Sin embargo, su respuesta es más eficaz en la eliminación de la infección que la generada por el sistema inmune innato, debido a que las células que la componen reconocen y responden específicamente frente a antígenos individuales a través de receptores altamente especializados<sup>31</sup>.

Los elementos que la componen son los linfocitos T (inmunidad adaptativa celular) y los linfocitos B (inmunidad adaptativa humoral). Éstos se forman a partir de un mismo precursor linfoide en la médula ósea. El precursor del linfocito T posteriormente migra al timo donde se produce la maduración y selección clonal del linfocito T mientras que el linfocito B madura en la médula ósea. Ambos expresan en su superficie receptores específicos de antígeno, conocidos como receptor de la célula T (TCR, de sus siglas en inglés) y receptor de la célula B (BCR, de sus siglas en inglés)<sup>31</sup>.

La inmunidad adaptativa se inicia cuando la célula dendrítica o célula presentadora de antígenos activa al linfocito T en los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides del aparato digestivo y del aparato

respiratorio superior). La activación del linfocito T está controlada por tres señales: la primera señal consiste en el reconocimiento entre el receptor de la célula T y el complejo antígeno:MHC presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno, siendo las células dendríticas las células presentadoras más eficientes en respuestas primarias. La segunda señal se debe a la interacción entre las moléculas de co-estimulación de la célula presentadora y sus respectivos ligandos en el linfocito T y la tercera señal se completa con el control que ejercen las citoquinas en la diferenciación y expansión clonal del linfocito T en una de sus tres formas de linfocito T efector: linfocito T citotóxico (LT-CD8), linfocito T colaborador o “helper” (LT-CD4) y linfocito T regulador<sup>31</sup>. El LT-CD8 reconoce antígenos presentados por las moléculas del MHC clase I y destruye células infectadas por virus o bacterias intracelulares. El LT-CD4 reconoce antígenos presentados por las moléculas del MHC clase II y se diferencia a distintos subtipos de LT-CD4: TH1, TH2 y TH17, con funciones inmunológicas diferentes que promueven la activación de otras células o la eliminación de células diana, bien directamente o a través de la síntesis de citoquinas inflamatorias que ejercen un efecto antiviral en las células infectadas<sup>31</sup>.

El linfocito B también se activa y prolifera a través de la unión del antígeno a su receptor convirtiéndose en células plasmáticas que se encargan de la producción de anticuerpos. Sin embargo la mayoría de los linfocitos B requieren ayuda de los linfocitos T colaboradores para conseguir una respuesta adecuada<sup>31</sup>.

Tras la resolución de la infección estas células persisten en el organismo como células memoria, protegiendo al individuo de futuras reinfecciones y generando una respuesta inmune que es más precoz e intensa que la primera.

La infección primaria por CMV induce la producción de anticuerpos y la generación de células T efectoras CD4 y CD8 que se encargan de controlar la replicación viral. Tras la resolución de la infección el virus queda latente e induce en las células T CD8 específicas un fenotipo determinado.

### **Inmunidad celular frente al CMV**

Tanto los linfocitos T CD8 como los CD4 específicos frente al CMV juegan un papel fundamental en la eliminación del virus<sup>56,57</sup>. Estudios iniciales mostraron que la respuesta inmune T específica se dirigía predominantemente frente a los antígenos virales pp65 e IE-1<sup>58-60</sup>, sin embargo se ha demostrado posteriormente que más del 70% del proteoma del CMV puede ser diana de los linfocitos T<sup>61</sup>. Los linfocitos T de memoria específicos de CMV que permanecen en la sangre periférica de pacientes seropositivos representan un porcentaje elevado del total de linfocitos T, llegando a ser del 40% en pacientes adultos<sup>62</sup>. Diversos estudios realizados tanto en humanos como en modelos murinos de CMV han mostrado que el porcentaje de linfocitos T CD8 específicos de CMV se incrementa con el tiempo. Se piensa que esto es debido a la constante reactivación viral desde el estado de latencia<sup>63-65</sup>.

El CMV induce en los linfocitos T citotóxicos específicos un fenotipo determinado caracterizado por la pérdida de expresión de moléculas de co-estimulación, CD27 y CD28, la pérdida de expresión del receptor de la IL7 y un aumento de la expresión de CD57, marcador asociado con la senescencia. Estas células T modificadas son funcionalmente competentes y ejercen su función citolítica en respuesta al estímulo antigénico mediante la liberación de citoquinas como TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2<sup>66</sup>.

La presencia pre-trasplante o la recuperación precoz de los linfocitos T-CD8 específicos frente al CMV se correlaciona con protección y control de la replicación

viral<sup>66</sup> mientras que la ausencia de esta respuesta celular T-CD8 específica se asocia con desarrollo de enfermedad o infección por CMV tanto en los pacientes que reciben un trasplante de médula ósea<sup>67,68</sup> como en los que reciben un trasplante de órgano sólido<sup>69-72</sup>. Para un efecto protector también es importante la recuperación de células específicas T CD4<sup>73</sup> y el porcentaje de células T CD8 específicas de CMV se correlaciona con el desarrollo de enfermedad<sup>74</sup>. La mayoría de los estudios mencionados evalúan la respuesta específica a pp65, sin embargo estudios recientes sugieren que la protección de la infección CMV postransplante se correlaciona con la presencia de células T CD8 específicas del antígeno IE-1<sup>57</sup> y niveles altos de células T de memoria específicas de CMV-IE-1 se asociaron con una mejor función renal<sup>75</sup>.

### **Inmunidad humoral frente al CMV**

Los anticuerpos específicos frente al CMV son capaces de limitar la diseminación viral y la gravedad de la infección<sup>76</sup>. Los anticuerpos neutralizantes están dirigidos predominantemente frente a los antígenos virales glicoproteína B y el complejo gH/gL<sup>77-79</sup>. La infección por CMV produce un incremento en el título de anticuerpos y en las células B de memoria con el tiempo, al igual que ocurre con las células T<sup>80,81</sup>.

## **4. - MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DEL CMV**

En su evolución, el CMV ha desarrollado una serie de mecanismos de evasión del sistema inmunológico focalizados en la inhibición de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas estrategias mantienen al virus camuflado y evitan que sea detectado por las células inmunes tanto en el proceso de infección lítica como en el estado de latencia<sup>38,39</sup>.

Además, el virus a raíz del uso de los fármacos antivirales ha sido capaz también, de desarrollar mecanismos de fármaco-resistencia que dificultan su destrucción en situaciones de inmunodepresión<sup>82</sup>.

### **Mecanismos de evasión del sistema inmunológico**

El CMV suprime la respuesta inmune innata y adaptativa tanto durante la fase de replicación aguda como durante el periodo de latencia. Lo logra a través de la síntesis de proteínas virales que actúan a distintos niveles.

A nivel del sistema inmune innato (Fig. 4), el CMV sintetiza:

- La IL-10 viral o las proteínas US28, US27 y US33 que bloquean la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos. Este efecto provoca un ambiente anti-inflamatorio local que disminuye la normal activación de células presentadoras de antígenos en el lugar de la infección y la atracción de las células T CD8 específicas<sup>83</sup>.
- La proteína viral UL16 interfiere en la expresión del receptor MICB y de las proteínas de la familia ULBPs en la superficie de las células infectadas impidiendo la activación de las células NK a través de la vía NKG2D. Este mecanismo se produce durante la fase de replicación viral aguda<sup>84</sup>. Un mecanismo diferente basado en la expresión de micro ARN virales (miARN), en concreto el miARN UL112-1 regula también el bloqueo de expresión de MICB en la superficie celular durante el estado de latencia<sup>85</sup>.



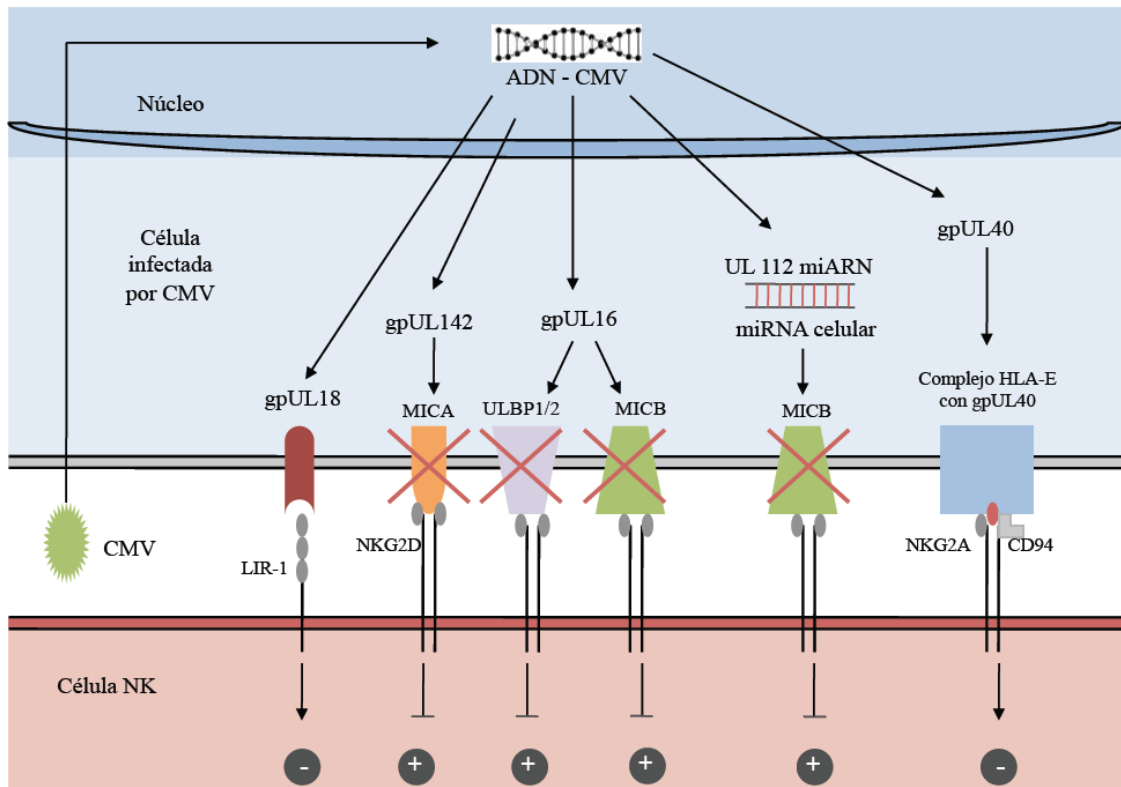


Figura 4: Mecanismos de inmunoevasión innata promovidos por el CMV en las células infectadas: disminución de la expresión de MICA y MICB ligandos del NKG2D (activador NK). Síntesis de UL18 ligando del receptor inhibidor LIR-1 en la célula NK. Aumento de la expresión del complejo HLA-E / gpUL40 que interacciona con el receptor inhibidor NKG2A de la célula NK.

- La proteína UL142 suprime la activación de la célula NK a través del receptor NKG2D bloqueando la expresión de MICA<sup>86</sup>.
- La proteína UL18, homóloga de las moléculas de MHC clase I, bloquea a las células NK a través de la activación del receptor inhibidor LIR-1<sup>87</sup>.
- La proteína UL40 incrementa la expresión de HLA-E que se une al receptor inhibidor NKG2A<sup>88</sup>.

A nivel del sistema inmune adaptativo el CMV anula la normal presentación de los péptidos virales<sup>89</sup>. Esto lo consigue por un lado interfiriendo en el ensamblaje, maduración y transporte de las moléculas del MHC clase I hacia la superficie celular y

por otro lado impidiendo la presentación del antígeno viral IE-1 a través de su fosforilación por el antígeno pp65<sup>90</sup>. Las proteínas virales involucradas en la interrupción de la expresión de las moléculas del MHC clase I son: US3 que retiene moléculas MHC clase I en el retículo endoplásmico. US6 que inhibe la función del transportador asociado al procesamiento del antígeno y US2 y US11 que degradan moléculas del MHC clase I en el citoplasma. Pacientes con infección por CMV presentan un incremento en la expresión génica de estos genes<sup>91</sup>.

Otra de las estrategias utilizadas por el CMV para mantenerse invisible para las células inmunes es la infección de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea donde permanecen en estado quiescente con una expresión génica limitada.

### **Mecanismos de resistencia a fármacos antivirales**

El genoma del CMV contiene los genes necesarios para su propia replicación, entre ellos se encuentra el gen UL54 que codifica a la ADN polimerasa viral<sup>92</sup>, la cual es diana de la mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de la infección y enfermedad por CMV como son el ganciclovir, cidofovir y foscarnet. El gen UL97 codifica otra enzima viral que también interviene en el proceso replicativo y a su vez es capaz de fosforilar el ganciclovir, paso necesario para su activación y la inhibición de la síntesis viral<sup>93</sup>. Mutaciones producidas por el CMV en estos genes le confieren resistencia a los antivirales y se pueden detectar a través de métodos genotípicos<sup>94</sup>. En la figura 5 se detalla un esquema de activación de los antivirales.

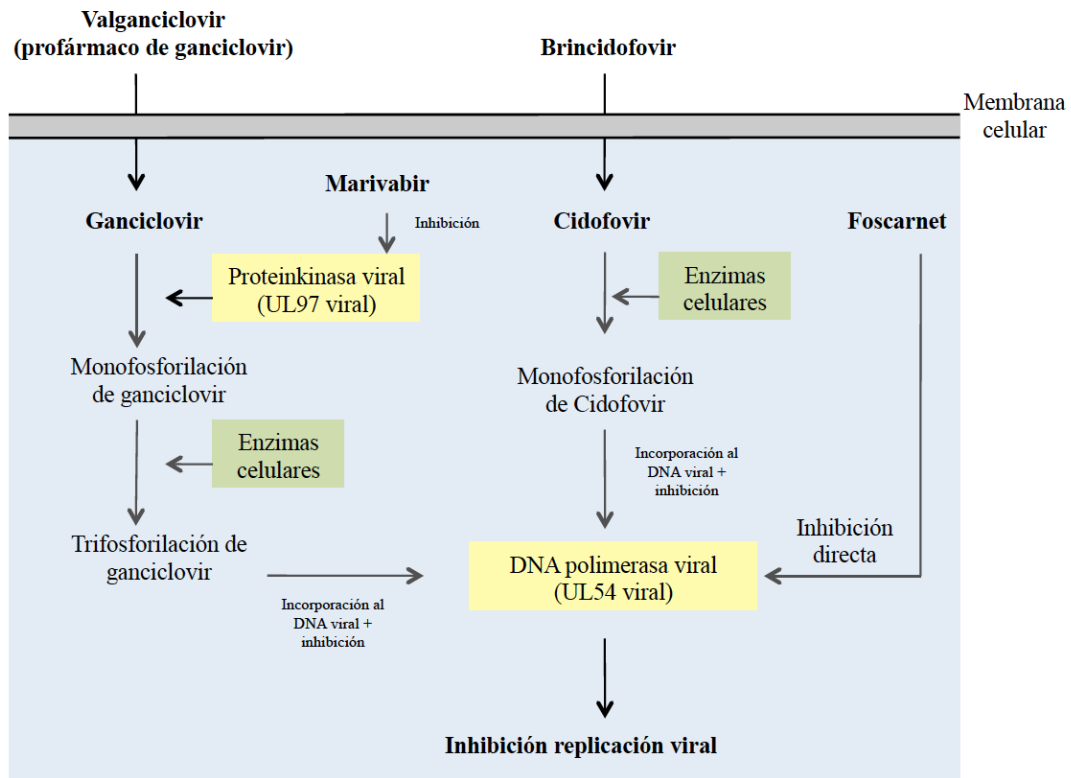


Figura 5: Esquema de activación de los antivirales.

## 5. - RELACIÓN DEL CMV Y EL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO (TOS).

La era moderna de la inmunosupresión en el trasplante comenzó en los años ochenta del pasado siglo con la aparición de la ciclosporina, a la que siguieron otros inmunosupresores (tacrolimus, ácido micofenólico, sirolimus, anticuerpos monoclonales), que mejoraron los resultados del trasplante de forma importante convirtiendo esta terapia en un tratamiento rutinario para los pacientes.

La mejora en los tratamientos que prevenían el rechazo agudo del órgano dio lugar al incremento de las complicaciones infecciosas. De ellas, la infección por CMV representa una de las principales complicaciones después del trasplante de órgano sólido. En estos pacientes la alteración de la respuesta inmune, por los fármacos inmunosupresores, les predispone a que el virus pase del estado de latencia al de

infección provocando la aparición de las recurrencias clínicas o reactivación del CMV<sup>95</sup>.

### Epidemiología de la infección por CMV en el TOS

El riesgo de infección de un paciente viene determinado por la interacción de dos factores: la exposición epidemiológica antes del trasplante, reflejado por la colonización o la presencia de infecciones latentes que puedan reactivarse tras el mismo, y por el estado neto de inmunosupresión, que incluye no sólo el tratamiento inmunosupresor recibido sino también otras situaciones médicas o iatrogénicas que incrementan el riesgo de infección<sup>96</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.- Factores que contribuyen al estado neto de inmunosupresión**

- Tratamiento inmunosupresor recibido: Tipo, secuencia temporal, intensidad y dosis acumulada
- Tratamientos inmunosupresores previos recibidos
- Integridad de la barrera mucocutánea (catéteres, vías periféricas, drenajes)
- Dificultades técnicas durante la cirugía: Sangrado, prolongada instrumentación.
- Neutropenia o linfopenia
- Inmunodeficiencias subyacentes: Enfermedades autoinmunes, hipogammaglobulinemia, alteración del sistema del complemento, otras enfermedades (HIV)
- Alteraciones metabólicas: Uremia, malnutrición, diabetes
- Infecciones virales: CMV, hepatitis B, hepatitis C
- Rechazo del injerto y tratamiento

En la era en la que las estrategias de prevención y monitorización viral no se usaban de forma generalizada la incidencia de infección y enfermedad por CMV eran elevadas (60% infección y 30% enfermedad)<sup>97</sup> y tanto la combinación serológica frente al CMV entre el donante y el receptor como el uso de anticuerpos anti-linfocitarios se comportaban como importantes factores de riesgo de enfermedad por CMV<sup>98</sup>. Esto sirvió para definir el riesgo de infección de los pacientes y clasificarlos en pacientes de alto, moderado o bajo riesgo de infección. Esta clasificación se sigue empleando actualmente para definir la estrategia de prevención<sup>99</sup>.

Los pacientes con más riesgo de infección o enfermedad por CMV son los pacientes seronegativos para CMV (R-) que reciben un órgano de un donante seropositivo (D+). Monto Ho fue el primero en demostrar en el año 1975 que el 80% de los receptores seronegativos se convertían a positivos después de recibir un riñón de un donante seropositivo<sup>100</sup>. La ausencia de inmunidad celular específica en el receptor junto con el tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo, da lugar a una importante replicación viral. El riesgo de desarrollar infección por CMV depende de la intensidad del tratamiento inmunosupresor recibido, y éste se relaciona frecuentemente con el tipo de órgano trasplantado. Los pacientes que reciben un trasplante pulmonar o cardiopulmonar son los que más riesgo presentan, seguidos de los trasplantados hepáticos, cardíacos, pancreáticos y con menor frecuencia los trasplantados renales<sup>101</sup>.

### CMV y trasplante renal

La infección y enfermedad por CMV sigue siendo una de las principales preocupaciones de los médicos dedicados al cuidado de los pacientes trasplantados. Es una complicación frecuente en los pacientes que reciben un trasplante renal<sup>95,102</sup>. Suele aparecer en el primer año postrasplante y cuando aparece tiene consecuencias directas e indirectas sobre el paciente y el injerto tanto a corto como a largo plazo<sup>103</sup>.

### Efectos clínicos

Los efectos que tiene la activación del CMV en pacientes trasplantados se pueden clasificar en efectos directos e indirectos.

Los efectos directos son bien conocidos, se relacionan con altas tasas de replicación viral y se presentan en forma de infección o enfermedad por CMV<sup>102</sup>. Se define infección al aislamiento del virus, la detección de proteínas virales (antigenemia) o la presencia de ADN/ARNm (viremia) del virus en cualquier líquido o tejido del

organismo. También se conoce como replicación asintomática. La infección es primaria cuando el CMV se detecta en un individuo que previamente era CMV seronegativo. La infección es persistente cuando la detección del virus se mantiene de forma prolongada en el tiempo en pacientes que se encuentran asintomáticos y la infección es recurrente cuando se produce la detección del virus al menos cuatro semanas después de haberse controlado la primera infección<sup>104</sup>.

La enfermedad por CMV se define cuando el paciente infectado presenta síntomas, bien en forma de síndrome viral o como afectación visceral. Se considera síndrome viral cuando existe fiebre  $> 38^{\circ}\text{C}$ , durante al menos 2 días en un periodo de 4 días, asociada a la presencia de leucopenia, trombocitopenia o elevación de transaminasas junto con la detección del virus en sangre. La afectación visceral por CMV se manifiesta por síntomas y signos en el órgano afectado. Las afectaciones viscerales más comunes son la neumonía, la enfermedad digestiva, la hepatitis, la encefalitis, la retinitis, la nefritis, la cistitis, la miocarditis y la pancreatitis. Para el diagnóstico de enfermedad se requiere la presencia de un cuadro clínico compatible junto con la presencia de lesiones histológicas en una biopsia y/o cultivo positivo para CMV<sup>104</sup>.

Los efectos indirectos son más difíciles de reconocer y se deben a la interacción de bajas tasas de replicación viral con el sistema inmune<sup>103</sup>. Se han asociado con un incremento de la morbilidad (infecciones oportunistas)<sup>105</sup>, pérdida del injerto y mortalidad a largo plazo<sup>105</sup>. En una serie de estudios prospectivos, Hartmann et al<sup>106</sup>. investigaron los efectos indirectos de la infección/enfermedad CMV, que aparece en receptores de trasplante renal durante los primeros 100 días postrasplante, y demostraron que, en ausencia de estrategias de prevención, la presencia de infección o enfermedad CMV se asociaba con un incremento del riesgo de rechazo agudo

tubulointersticial<sup>97</sup>, de diabetes mellitus postrasplante<sup>107</sup>, de mortalidad y de pérdida del injerto a largo plazo<sup>108-110</sup>. Kalil et al. en un metanálisis describen resultados similares a lo descrito previamente<sup>111</sup> y este efecto deletéreo es aún mayor en receptores seronegativos para CMV que reciben un donante seropositivo (R-/D+)<sup>98,112</sup>.

### Estrategias de control del CMV

El control del CMV postrasplante es una prioridad clínica dada la relevancia que ha alcanzado este virus en los pacientes trasplantados, tanto a corto como a largo plazo.

En los últimos años se ha avanzado en el manejo de esta complicación postrasplante debido a la aparición de fármacos antivirales eficaces en el control de la replicación viral, a la mejora en los métodos diagnósticos, al uso de estrategias de prevención y al mejor conocimiento de la respuesta inmune del huésped frente al CMV, consiguiendo disminuir el riesgo de infección y enfermedad por CMV<sup>105,113</sup>, el riesgo de rechazo agudo y el riesgo de mortalidad y pérdida del injerto a largo plazo<sup>105,106,111,114-116</sup>.

### Monitorización virológica

Los tests diagnósticos son la base del manejo clínico de los pacientes con CMV y éstos deben ser sensibles para poder detectar la replicación viral en estadios precoces y para llevar a cabo la monitorización virológica del paciente postrasplante<sup>117</sup>.

Hay muchas técnicas para el diagnóstico de la infección. El aislamiento del virus en cultivo o la variante rápida de cultivo (*shell vial*) es un proceso lento y poco sensible y sirvió en su momento para diagnosticar la infección y controlar parte de sus efectos negativos, sin embargo ha sido superado hace tiempo por otras pruebas. Las pruebas serológicas se utilizan en la evaluación de donantes y receptores para definir el estado de latencia pero su utilidad en el seguimiento postrasplante es reducida<sup>118</sup>. Hoy en día,

las pruebas que más interés tienen son las que permiten estimar la carga viral en sangre periférica, como son la antigenemia pp65 y la detección del ADN viral en suero mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-CMV). La antigenemia consiste en la detección directa del antígeno pp65 de CMV en leucocitos de sangre periférica, fundamentalmente neutrófilos. La viremia se define como la detección de ADN o ARN en muestras de sangre completa, plasma o leucocitos<sup>117</sup>.

Existen varios estudios que evalúan la relación existente entre los dos tests encontrando resultados comparables en algunos casos<sup>119</sup> y en otros se demuestra una mejor sensibilidad de la técnica cuantitativa de la PCR para la detección del virus<sup>120,121</sup>. La cuantificación del ADN del CMV en sangre permite una estimación más directa de la carga viral que la antigenemia, aunque en ausencia de tratamiento existe una correlación aceptable entre los valores obtenidos con ambas técnicas.

La antigenemia como test ha sido validado en diversos ensayos clínicos en pacientes inmunosuprimidos<sup>122</sup>, sin embargo tiene algunas limitaciones ya que su determinación depende del recuento leucocitario y no es capaz de cuantificar la carga viral. La viremia en sangre se puede realizar de forma cualitativa o cuantitativa. Tanto la antigenemia como la PCR-CMV cuantitativa nos permiten realizar el diagnóstico y monitorizar virológicamente al paciente, siendo herramientas útiles para establecer el inicio del tratamiento anticipado<sup>123</sup>.

### **Fármacos antivirales y estrategias de prevención**

El manejo inicial de la infección y enfermedad por CMV se realizaba con la administración de ganciclovir intravenoso durante 14 días e inmunoglobulinas específicas anti CMV durante 3 meses. Sin embargo, el desarrollo posterior de fármacos antivirales potentes de administración oral y el uso de estrategias de prevención



supusieron el primer hito en el control y manejo de esta complicación y, a día de hoy, son las piedras angulares de la prevención del CMV.

Actualmente, **existen dos estrategias para la prevención de la infección o enfermedad por CMV**, la profilaxis universal (PU) y la terapia anticipada (TA).

La profilaxis universal consiste en administrar un antiviral inmediatamente después del trasplante renal y por un tiempo definido entre tres y seis meses, en función del riesgo de cada paciente<sup>91</sup>. La terapia anticipada consiste en la monitorización regular de la carga viral del paciente, mediante antigenemia pp65 o PCR CMV en sangre, y el inicio de un tratamiento antiviral precoz en el momento en el que se detecte replicación viral antes de la aparición de los síntomas<sup>104</sup>.

El uso de una u otra estrategia se establece, habitualmente, en base al riesgo de infección del paciente que viene establecido por la carga de inmunosupresión recibida y por la combinación serológica frente al CMV entre el donante y el receptor. Los pacientes con más riesgo, como son los receptores seronegativos que reciben un órgano seropositivo, reciben profilaxis universal<sup>99</sup>.

El uso generalizado de estas estrategias, ya sea profilaxis universal o terapia anticipada, ha demostrado un descenso significativo del riesgo de enfermedad por CMV y del riesgo de muerte<sup>124,125</sup>. Cuando se comparan ambas estrategias de prevención sólo se encuentran diferencias en la viremia CMV, lo cual es inherente a la propia estrategia, no habiendo diferencias significativas en el riesgo de enfermedad por CMV, rechazo o supervivencia del paciente<sup>126-127</sup>.

Los fármacos que han demostrado mayor eficacia para el control del CMV son ganciclovir intravenoso, ganciclovir oral y valganciclovir oral. Se emplean tanto para profilaxis universal como terapia anticipada. El valganciclovir supuso una revolución

con respecto a ganciclovir, dada su mayor potencia y su mejor biodisponibilidad<sup>129</sup>. Existen otros antivirales como foscarnet y cidofovir, sin embargo no se usan de primera línea ya que presentan una toxicidad importante y requieren un seguimiento clínico estrecho. Se pueden emplear en casos de infecciones resistentes por CMV en las que se demuestra una mutación en el gen UL97 que impide la activación del ganciclovir<sup>130</sup>. Otros antivirales en estudio son brincidofovir, que es la forma conjugada lipídica del cidofovir, cyclopropavir y letermovir. Letermovir tiene un mecanismo de acción diferente al resto de antivirales. Inhibe la replicación viral inhibiendo la terminasa viral que es una enzima viral que se encarga del empaquetamiento de las partículas virales. Se ha usado en pacientes trasplantados de médula ósea y de riñón consiguiendo disminuir la incidencia de infección por CMV y con un mejor perfil de seguridad que el resto de antivirales<sup>131,132</sup>. Los principales efectos secundarios son la nefro y mielotoxicidad que limita su uso continuado.

### Monitorización inmunológica

A pesar del uso de los fármacos antivirales potentes y las estrategias de prevención sigue existiendo un porcentaje de infección y enfermedad por CMV no despreciable que debemos mejorar y perseguir. Para ello, son deseables otras herramientas dirigidas a definir mejor el riesgo de infección de los pacientes y a mejorar la respuesta inmune del huésped frente a la infección.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto cómo la respuesta inmune celular, orquestada por los linfocitos T CD4 y CD8 específicos de CMV, desempeña un papel crucial en el control de la replicación viral.

El análisis de estas sub-poblaciones linfocitarias refleja la capacidad del paciente para controlar el virus, permite identificar pacientes en riesgo de desarrollar infección o

enfermedad por CMV postrasplante y puede ayudar a los clínicos a definir mejor la estrategia de prevención específica para cada paciente<sup>133</sup>.

Existen distintos métodos analíticos que evalúan la inmunidad celular específica<sup>133</sup>. El principio básico de todos ellos consiste en la estimulación en un cultivo celular de las células T con antígenos del CMV. Tras la estimulación las células T son fijadas o teñidas con anticuerpos o se utiliza el sobrenadante para medir la liberación de citoquinas. Las técnicas usadas habitualmente son: Citometría de flujo con el empleo de tinción de tetrámeros y citoquinas intracelulares, Immunoknow (ensayo de liberación de ATP), ensayo Spot inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISpot) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA – quantiferon CMV). Fig. 6<sup>134</sup>.

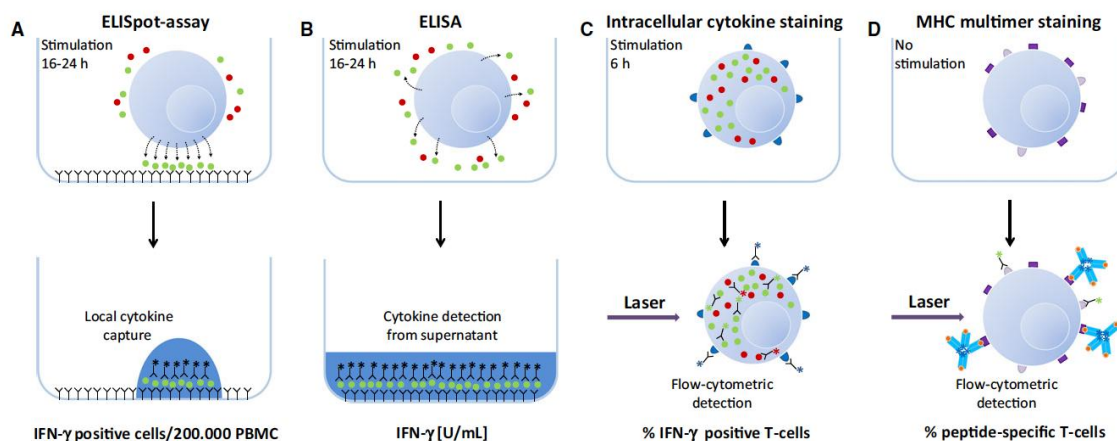


Figura 6: Métodos específicos de CMV para la determinación de la inmunidad celular específica<sup>134</sup>.

El único que está aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) es el *immunoknow*, sin embargo éste no es específico de CMV y predice el riesgo de infección en general por lo que se usa como medida global de la inmunosupresión. El resto de técnicas tienen sus ventajas e inconvenientes siendo actualmente utilizadas en el ámbito de la investigación (Tabla 3).

Tabla 3: Métodos analíticos específicos de la respuesta mediada por los linfocitos T frente al CMV.

	Ensayo de liberación de ATP	Quantiferon CMV	ELISpot	Tinción de citoquinas intracelulares (citometría de flujo)	Tinción de pentámeros (citometría de flujo)
Ventajas	Autorizado FDA	Aprobado Unión europea Alta sensibilidad	Alta sensibilidad	Alta sensibilidad Rápida	Alta sensibilidad
Inconvenientes	No específico	Poco versátil – dirigido a población europea Determinación sólo de células T CD8	No diferencia entre LT CD4 y LT CD8 Requiere lector de ELISpot	Actualmente como herramienta de investigación	Requiere conocer el tipo de HLA individual

La mayoría de estos ensayos no disponen de un punto de corte adecuadamente validado para definir la positividad, con excepción del quantiferon CMV para el cual un valor positivo se define por un nivel de IFN  $\geq 0,2$  UI/ml.

Esta monitorización inmunológica está demostrando ser un avance importante en la capacidad de predecir qué pacientes tienen más riesgo de desarrollar la infección viral postrasplante y podría ser de utilidad en el control del CMV postrasplante<sup>133</sup>.

### Otras estrategias

Existen otras estrategias dirigidas a mejorar la respuesta inmune del huésped frente a la infección<sup>130</sup>. Estas herramientas son la vacuna frente al CMV, la inmunoterapia adoptiva y el empleo de fármacos inmunosupresores con un perfil protector frente al CMV como son los inhibidores del complejo mTOR.

El objetivo de la vacuna es el de generar una respuesta inmune tanto humoral como celular en el huésped. Existen varios preparados de vacunas (Fig. 7)<sup>130</sup>. El más avanzado es la forma recombinante de gB soluble, que se administra con el adyuvante MF59<sup>135</sup>. Esta vacuna ha demostrado una excelente inmunogenicidad y seguridad en receptores seronegativos y es capaz de amplificar la respuesta en receptores seropositivos. Ha sido probada antes del trasplante en pacientes seronegativos trasplantados de riñón e hígado<sup>136</sup> demostrando que es capaz de producir anticuerpos

anti-gB en pacientes con enfermedad terminal hepática y renal, que es capaz de disminuir la tasa de infección CMV postrasplante en este grupo de pacientes así como disminuir la necesidad de tratamiento antiviral o la duración del mismo. Otro de los preparados es la vacuna ADN que contiene las proteínas virales gB y pp65 y genera una respuesta inmune humoral y celular en el huésped. Ha sido probada en pacientes trasplantados de médula ósea<sup>137</sup>. La vacuna alphavirus es otro de los preparados y contiene la glicoproteína gB y una proteína de fusión con los antígenos virales IE-1 y pp65. Produce una espectacular respuesta celular específica frente al CMV de LT CD8 y CD4 y una respuesta humoral con la producción de anticuerpos neutralizantes anti-gB. Ha sido probada en voluntarios sanos y aún no se dispone de resultados en pacientes trasplantados<sup>138</sup>.




	Antigens	Immune responses
 Recombinant soluble gB	Modified glycoprotein B	IgG responses +++ gB CD4 T-cells +/-
 Alphavirus replicon	glycoprotein B pp65-IE1 fusion	IgG gB responses +++ pp65 CD8 T-cells +++ IE1 CD8 T-cells +++ pp65 CD4 T-cells +++ IE1 CD4 T-cells +++ gB CD8 T-cells ++ gB CD4 T-cells ++
 Plasmid DNA	glycoprotein B pp65	IgG gB responses ++ pp65 CD4 +CD8 T-cells ++ gB CD4 + CD8 T-cells -

Figura 7: Características de los distintos preparados de vacunas<sup>130</sup>

El mejor conocimiento del sistema inmune está permitiendo el desarrollo de una inmunoterapia adoptiva personalizada. Esta modalidad consiste en la expansión ex vivo y posterior infusión en el paciente de clones específicos de linfocitos T frente a moléculas diana, como son los antígenos virales<sup>130</sup>. Está siendo estudiada fundamentalmente en pacientes trasplantados de médula ósea con varios estudios clínicos en marcha (*clinicaltrials.gov*)<sup>139</sup>. Esta estrategia no está tan extendida en los pacientes con trasplante de órgano sólido ya que, comparado con los trasplantados de médula ósea, presentan un riesgo inferior de complicaciones por CMV, la inmunosupresión recibida no es tan agresiva y el sistema inmunológico mantiene un mínimo de funcionalidad que junto con los antivirales disponibles minimizan el riesgo de enfermedad por CMV.

En los años ochenta la ciclosporina revolucionó el campo del trasplante permitiendo la mejora de los resultados a corto plazo, disminuyendo las tasas de rechazo agudo y aumentando la supervivencia del paciente y del injerto. En los años noventa se fueron sumando otros inmunosupresores (micofenolato mofetilo (MMF), daclizumab, tacrolimus, basiliximab, sirolimus y everolimus) que disminuyeron aún más la incidencia de rechazo agudo, sin embargo no mejoraron significativamente la supervivencia del paciente ni del injerto conseguida con la irrupción de la ciclosporina. La combinación de estos fármacos en una triple terapia es el pilar sobre el que se asienta el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento y a día de hoy se basa en la combinación de un inhibidor de calcineurina, preferiblemente tacrolimus frente a ciclosporina por su mayor eficacia, esteroides y un inhibidor de la síntesis de purinas como el ácido micofenólico.

Esta combinación es la que mejores resultados ha demostrado en cuanto a función renal y supervivencia del injerto<sup>140</sup> y permite tener unos resultados de

supervivencia del paciente y del injerto a corto plazo excelentes. Sin embargo los resultados a largo plazo han mejorado sólo ligeramente desde los años ochenta<sup>141</sup>. Las causas de pérdida del injerto y mortalidad a largo plazo se explican por un conjunto de patologías y enfermedades progresivas que incluyen rechazo crónico, nefrotoxicidad crónica por inhibidores de calcineurina, enfermedad cardiovascular, infecciones y neoplasias que acontecen con el uso prolongado de los fármacos inmunosupresores. Estas circunstancias hacen que se siga investigando en nuevos fármacos o nuevas combinaciones entre los ya existentes que minimicen los riesgos derivados de la sobre inmunosupresión al mismo tiempo que mantienen su potencia inmunosupresora.

La aparición de los inhibidores de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, de sus siglas en inglés), sirolimus y everolimus, a finales de los años noventa y principios del año dos mil permitió la búsqueda de estrategias de combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción que permitieran disminuir los efectos adversos derivados del uso de los inhibidores de calcineurina. De esta forma se demostró, en estudios randomizados y controlados un efecto protector frente al CMV de los inhibidores mTOR, tanto cuando se utilizaban de novo, asociado a esteroides y ácido micofenólico como cuando se utilizaban en combinación con un inhibidor de calcineurina<sup>142</sup>. Los mecanismos que explican este efecto protector de los inhibidores mTOR son múltiples. Por un lado estos fármacos bloquean el complejo enzimático mTORC1<sup>143</sup>. Dicho complejo es utilizado por el virus para la generación de proteínas virales necesarias para la propagación viral, por lo que su inhibición limitaría la síntesis de dichas partículas virales e impediría la propagación del virus. Por otro lado, los inhibidores mTOR promueven la expansión de células T específicas de virus<sup>144,145</sup> y generan un ambiente de citoquinas pro-inflamatorias que favorece la activación de los distintos elementos de la inmunidad innata dando lugar a un estado anti-viral<sup>146</sup> (Fig. 8).

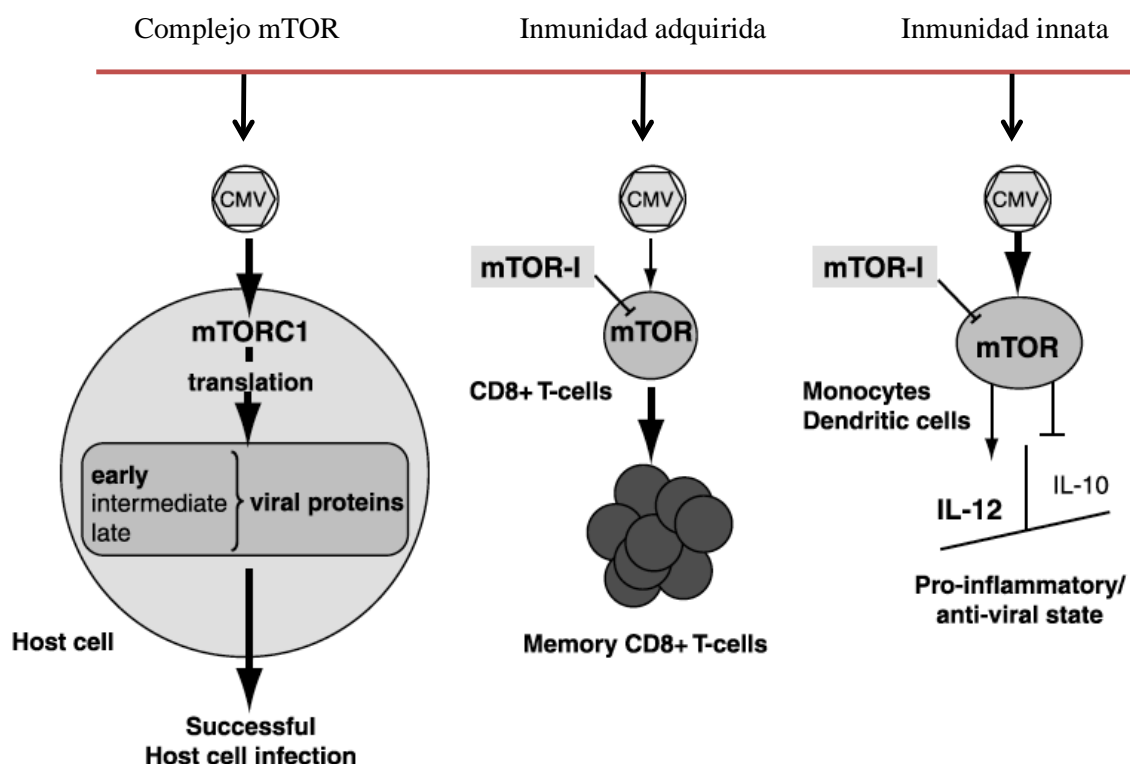


Figura 8: Mecanismos moleculares del efecto anti-CMV de los inhibidores mTOR<sup>147</sup>.

Sin embargo, a pesar de este efecto beneficioso, los inhibidores mTOR no se recomiendan como tratamiento inicial por su mayor incidencia de rechazo agudo y de forma general se emplean de segunda línea o en asociación con un inhibidor de calcineurina<sup>148</sup>.

En Enero de 2016 el trasplante da un nuevo paso hacia delante. Vincenti *et al.* demuestran que belatacept mejora los resultados a largo plazo en los pacientes trasplantados de riñón<sup>149</sup>. Belatacept, bloquea la señal de coestimulación y es el primer fármaco inmunosupresor que ha sido capaz de aumentar la supervivencia del injerto y del paciente a largo plazo en un ensayo clínico fase III desde la aparición de la ciclosporina en 1983. Este hecho da pie a seguir investigando en futuras combinaciones de fármacos con el objetivo de mejorar los resultados a largo plazo.



## **HIPÓTESIS**



El CMV humano induce un fenotipo determinado en células citotóxicas. Estos linfocitos citotóxicos podrían formar parte de la respuesta inmune específica frente al virus y de la constelación de células efectoras del daño tisular.

Los pacientes trasplantados de riñón con un riesgo elevado de enfermedad por CMV y con inmunidad específica frente a dicho virus (elevada respuesta T CD8 anti-CMV o NK CD94/NKG2C+) tendrán menos riesgo de contraer la enfermedad o de presentar replicación del virus en sangre tras el trasplante.

La monitorización de la respuesta tanto innata como adaptativa frente al CMV podría servir para optimizar el esquema terapéutico de los pacientes en riesgo de sufrir infección por CMV.



## **OBJETIVOS**



## **1. - OBJETIVO PRINCIPAL**

Conocer la incidencia de infección y enfermedad por CMV postrasplante en una cohorte retrospectiva y prospectiva y analizar si la monitorización inmunológica puede ser útil para el manejo del CMV postrasplante.

## **2. - OBJETIVOS SECUNDARIOS**

### **Estudio Clínico**

Conocer la incidencia de infección y enfermedad por CMV, bajo estrategias de prevención, en una cohorte retrospectiva y prospectiva de trasplantados de riñón.

Analizar la asociación de la replicación viral postrasplante con la supervivencia del paciente y del injerto a largo plazo y con otros eventos clínicos relacionados con el CMV en la cohorte retrospectiva y prospectiva de pacientes trasplantados de riñón.

### **Monitorización inmunológica**

Analizar la respuesta específica de linfocitos T CD4 y CD8 a antígenos de CMV, IE-1 y pp65, en pacientes trasplantados de riñón antes del trasplante y durante los dos primeros años postrasplante.

Cuantificar la frecuencia de células NK y linfocitos T que expresan receptores de la familia NKG2: CD94/NKG2A, CD94/NKG2C y NKG2D en pacientes trasplantados de riñón antes del trasplante y durante los dos primeros años postrasplante.

Relacionar la aparición de replicación viral postrasplante con la frecuencia de células T específicas de CMV y el porcentaje de células NK y linfocitos T con expresión de receptores de la familia NKG2 antes del trasplante y durante el primer año postrasplante.





## **PACIENTES Y MÉTODOS**



Para dar respuesta a los objetivos planteados, el trabajo consta de dos estudios diferentes, un estudio retrospectivo clínico y un estudio prospectivo, el cual a su vez tiene dos fases, una clínica y otra experimental realizadas de forma paralela. Se detallan, a continuación, los pacientes y métodos de cada uno de los estudios.

## 1. – ESTUDIO RETROSPECTIVO

### Pacientes

Incluimos en el estudio un total de 408 pacientes con insuficiencia renal crónica que recibieron un injerto renal en el Hospital Universitario La Paz entre Enero de 1998 y Diciembre de 2008 (se eligió diciembre de 2008, para que al menos los pacientes tuvieran un seguimiento clínico de cinco años).

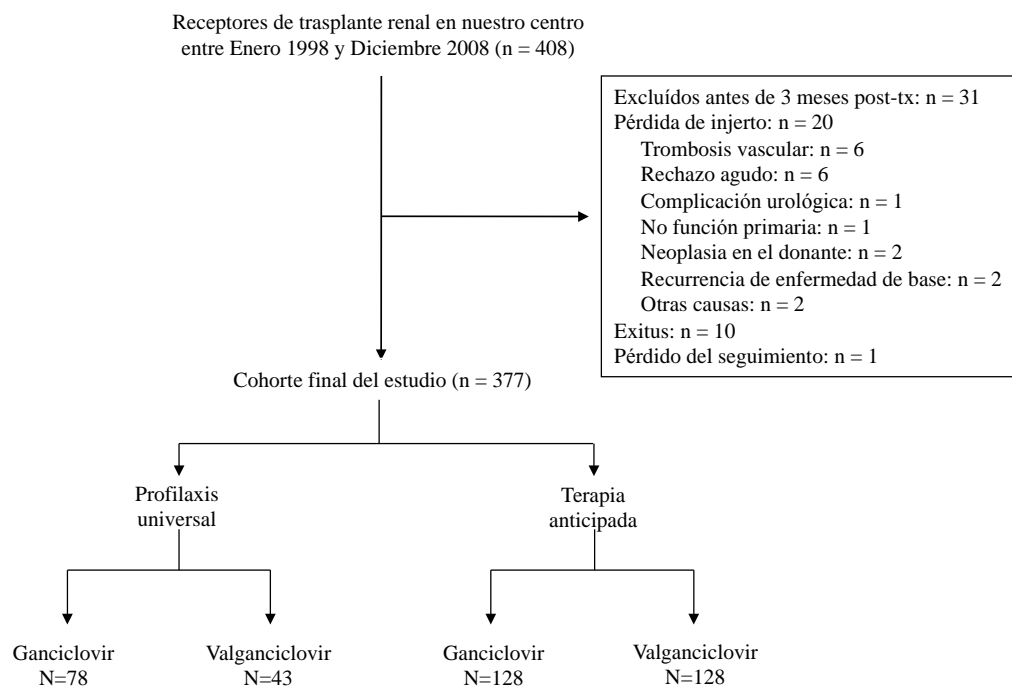


Figura 9: Diagrama de flujo de los pacientes incluidos según la estrategia de prevención.

Se excluyeron del análisis treinta y un pacientes debido a fracaso precoz del injerto, fallecimiento o pérdida de seguimiento en los primeros 3 meses después del trasplante (ninguna de estas pérdidas fueron secundarias a enfermedad por CMV).

El número total de pacientes incluidos fue de 377. La Figura 9 muestra la distribución de los pacientes según la estrategia de prevención y el antiviral empleado.

## **Métodos**

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y unicéntrico, en el que la variable principal de interés fue la infección o enfermedad por CMV en cualquier momento después del trasplante renal.

Se crearon dos cohortes de pacientes basadas en la existencia o no de infección o enfermedad por CMV después del trasplante (grupo CMV y grupo no CMV, respectivamente). Se analizaron los resultados de forma global y según la estrategia de prevención utilizada (profilaxis universal o terapia anticipada).

Los pacientes se siguieron hasta el fallecimiento, pérdida de seguimiento o finalización del estudio en Diciembre de 2013. A los pacientes que perdieron el injerto (vuelta permanente a diálisis), se les siguió durante el periodo de diálisis hasta su fallecimiento o hasta la finalización del estudio en Diciembre de 2013.

Los datos de los donantes y los receptores se recogieron de las historias clínicas del hospital. La selección de los donantes fue homogénea a lo largo de todo el periodo de estudio y no se realizó estudio histológico al injerto renal pre-trasplante.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital.

Se incluyeron un total de 377 pacientes, de los cuales 344 (91,2 %) fueron primeros trasplantes y 33 (8,8 %) re-trasplantes. Doscientos cuarenta y cuatro (64,7 %) pacientes eran varones y 133 (35,3 %) mujeres. La edad media y desviación estándar de los receptores y los donantes en el momento del trasplante fue de  $48,6 \pm 13,4$  y  $46,9 \pm 14,3$  años respectivamente. El 93,9 % (N = 354) de los pacientes recibieron un injerto renal de donante cadáver, el 5 % (N = 19) de donante vivo relacionado y el 1,1 % (N = 4) de donante en asistolia.

### **Estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección o enfermedad por CMV postrasplante**

#### **Estrategias de prevención:**

**A) Profilaxis universal:** Se utilizó en receptores seronegativos y/o en receptores seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con OKT3 o con anticuerpos anti-linfocitarios. Hasta Octubre de 2003 la profilaxis antiviral se realizó con ganciclovir (N=78 pacientes) y a partir de Octubre de 2003 con valganciclovir (N=43 pacientes). La duración de la profilaxis fue de 3 meses (media  $\pm$  DS:  $3,0 \pm 0,84$  meses).

**B) Terapia anticipada:** Se utilizó en receptores seropositivos que no recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales ni OKT3. En estos pacientes se realizaba monitorización virológica mediante antigenemia pp65 de forma semanal en el primer mes, quincenal el 2º y 3º mes y mensual del 4º al 12º mes. Cuando se detectaba replicación viral se iniciaba tratamiento con ganciclovir (hasta Octubre 2003, N=128) o valganciclovir (a partir de Octubre 2003, N=128).

**Diagnóstico:**

El seguimiento virológico y el diagnóstico se realizaron mediante la evaluación de la antigenemia pp65. Se consideró que había replicación de CMV cuando la antigenemia pp65 era  $> 5$  células positivas /  $2 \times 10^5$  leucocitos. Los pacientes con infección por CMV presentaban antigenemia pp65 positiva sin síntomas y los pacientes con enfermedad por CMV presentaban síntomas (síndrome viral o enfermedad invasiva) además de la antigenemia positiva.

**Tratamiento:**

Para los casos de infección por CMV se empleó en la mayor parte de los casos tratamiento antiviral con ganciclovir (antes de Octubre de 2003) o valganciclovir (a partir de Octubre de 2003) ajustado a función renal. En algunos casos además del tratamiento antiviral se redujo la dosis de MMF y en otros sólo se redujo la dosis de MMF sin utilizar fármaco antiviral.

Los casos severos de enfermedad por CMV se trataron con ganciclovir iv (5 mg/kg cada 12 horas, 2-3 semanas), disminución de la dosis de MMF y continuación con ganciclovir o valganciclovir oral 2-3 semanas más.

El antiviral se suspendió habitualmente después de 2 controles de antigenemia pp65 negativos consecutivos.

**Definición de otras variables analizadas en el estudio:**

**Retraso en la función inicial del injerto:** Definida como la necesidad de diálisis en la primera semana postrasplante.

**Complicaciones quirúrgicas** en los primeros 6 meses postrasplante: Definida como hemorragia que requiere re-intervención, trombosis vascular, fístula urinaria o linfocele que requiere intervención quirúrgica.

**Rechazo Agudo:** Sólo se consideraron para el análisis los rechazos diagnosticados por biopsia que aparecieron en cualquier momento después del trasplante. Se trataron de acuerdo al grado histológico según la clasificación de Banff 2009<sup>150</sup>. Los episodios se trataron con corticoides iv. En los episodios severos, resistentes al tratamiento con esteroides o en los rechazos agudos mediados por anticuerpos se emplearon otros tratamientos como muromonab-CD3 (OKT3), timoglobulina, inmunoglobulina iv, plasmaféresis o rituximab. El rituximab fue empleado sólo en 2 pacientes como tratamiento del rechazo.

**Eventos clínicos postrasplante:** Se recogieron los siguientes eventos clínicos: infecciones bacterianas que requirieron ingreso hospitalario después del trasplante, existencia de neoplasia postrasplante, diabetes mellitus postrasplante (definida por la necesidad de antidiabéticos orales o insulina) y enfermedad cardiovascular postrasplante: cardiopatía isquémica (infarto agudo de miocardio o angor inestable), enfermedad isquémica cerebral (accidente cerebrovascular o isquémico transitorio) y enfermedad arterial periférica (amputación de algún miembro o colocación de stent arterial).

### **Análisis estadístico**

La descripción de las variables cuantitativas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico (RIC). Se empleó el test Chi cuadrado para estudiar la asociación entre variables cualitativas y el test t-Student para comparar medias de variables cuantitativas.

## **1.- Análisis de supervivencia:**

Se realizó un análisis de supervivencia del paciente y del injerto. Se estimó la función de supervivencia por el método de Kaplan-Meier en función de la presencia o ausencia de infección/enfermedad por CMV y según la estrategia de prevención frente al CMV empleada. Se compararon las curvas de supervivencia con la prueba del Log-rank. En el análisis de supervivencia del paciente se consideró evento a la muerte del paciente por cualquier causa y se consideraron censuras los casos de pérdidas de seguimiento y los casos en los que no ocurrió el evento al finalizar el estudio (31 Diciembre 2013). Los pacientes que perdieron el injerto fueron seguidos hasta su muerte o finalización del estudio.

En el análisis de supervivencia del injerto se consideró evento a la pérdida del injerto por cualquier causa, definida como la vuelta definitiva a diálisis y se consideraron censuras los casos de pérdidas de seguimiento, los casos en los que no ocurrió el evento al finalizar el estudio (31 Diciembre 2013) y la muerte con injerto funcionando.

## **2.- Modelo de riesgo proporcional o de Cox:**

Para estudiar posibles factores asociados al riesgo de infección/enfermedad por CMV, mortalidad y pérdida del injerto se realizó un estudio univariante y multivariante con modelos de regresión de riesgos proporcionales o modelo de Cox. Aquellas variables con efectos clínicos y un valor de  $p < 0,2$  en el análisis univariante se incluyeron en el modelo multivariante. Se consideró significativo cuando la  $p < 0,05$ . Estos análisis se realizaron por duplicado, por un lado considerando la infección y enfermedad CMV como variable agregada (modelo 1) y por otro lado teniendo en cuenta de manera separada la infección de la enfermedad CMV (modelo 2).



## 2. – ESTUDIO PROSPECTIVO: Con dos fases: clínica y experimental

### Pacientes

Incluimos en el estudio un total de 82 pacientes con insuficiencia renal crónica que recibieron un injerto renal en el Hospital Universitario La Paz entre abril de 2010 y noviembre de 2011.

Veintiún pacientes fueron excluidos del estudio de monitorización clínica, virológica e inmunológica por diversas razones, que se especifican en la Fig. 9. Cuarenta y seis pacientes recibieron profilaxis universal y quince terapia anticipada como estrategia de prevención de la enfermedad por CMV postrasplante.

La distribución de los pacientes de acuerdo a la estrategia de prevención se muestra en la Figura 10.

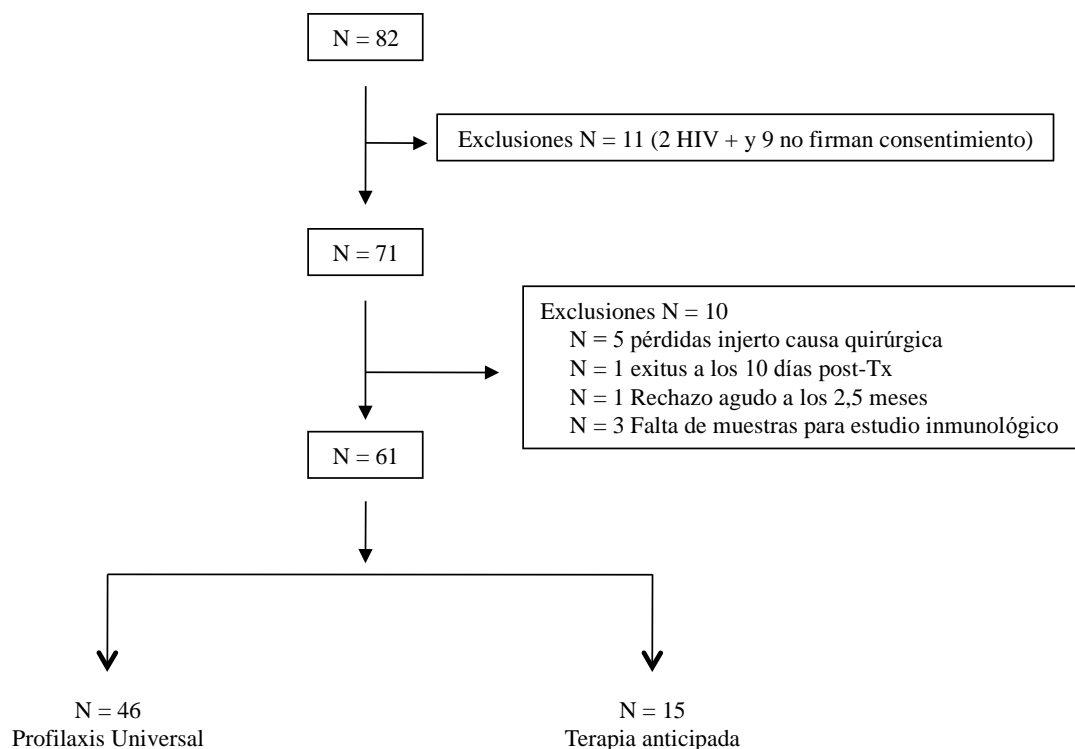


Figura 10: Distribución de los pacientes incluidos según la estrategia de prevención utilizada.

## **Métodos: Fase clínica**

Se realizó un seguimiento clínico y virológico de los pacientes durante el primer año postrasplante en busca de replicación por CMV sintomática o asintomática. Los datos clínicos se recogieron a medida que los pacientes se fueron incorporando en el estudio. Las tablas 5 y 6 resumen las características demográficas y los datos peritrasplante de los 61 pacientes incluidos según la presencia o ausencia de replicación viral y la estrategia de prevención utilizada.

### **Monitorización y diagnóstico de la replicación CMV postrasplante:**

El seguimiento virológico se efectuó mediante evaluación de la antigenemia pp65 en sangre. Se realizó de rutina semanalmente durante el primer mes, quincenal el segundo y tercer mes, y mensualmente del cuarto al duodécimo mes.

El diagnóstico de replicación por CMV se hizo mediante la determinación de la antigenemia pp65 en sangre periférica. Se consideró positiva cuando se detectaron al menos 5 células positivas / 200.000 leucocitos. En los casos en los que la antigenemia pp65 era menor de 5 células se repitió la determinación en una semana para su confirmación. Tras el diagnóstico de replicación por CMV se inició valganciclovir oral y/o se disminuyó la inmunosupresión en función de la gravedad del cuadro y se monitorizó la antigenemia pp65 una vez por semana. Se consideró remisión virológica a la negativización de la antigenemia en sangre en al menos dos determinaciones separadas entre sí una semana.

Se definió enfermedad por CMV a la presencia del virus en sangre detectado mediante antigenemia pp65 acompañado de signos y síntomas de enfermedad. La enfermedad por CMV se clasificó en síndrome viral o enfermedad tisular invasiva. El síndrome viral por CMV se definió como la presencia del virus en sangre (antigenemia

pp65 > 20 células/200,000) acompañado de fiebre (>38°C en ≥ dos ocasiones en ≥ 24 h en un periodo de 7 días) y al menos uno de los siguientes criterios: astenia, leucopenia o trombopenia. La enfermedad tisular invasiva se definió por la presencia de síntomas o signos relevantes de disfunción del órgano en cuestión que no podía ser explicado por otras causas con antigenemia positiva. Se consideró remisión clínica a la desaparición de los síntomas. Se definió infección por CMV a la presencia del virus en sangre (antigenemia positiva) sin síntomas de enfermedad.

Para el estudio inmunológico (fase experimental), los pacientes fueron clasificados en tres grupos según la presencia o ausencia de replicación y de síntomas postrasplante (Figura 11).

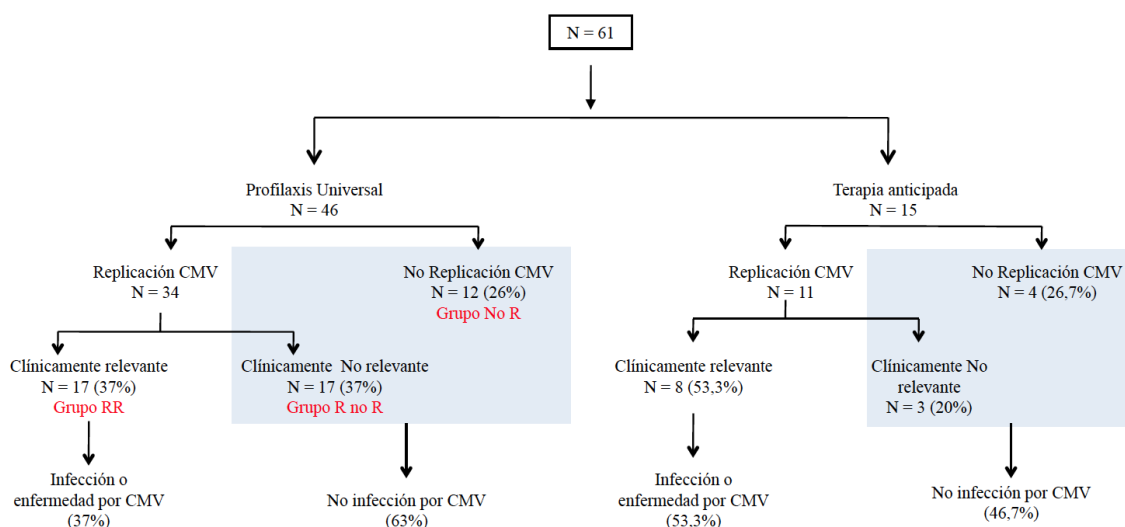


Figura 11: Diagrama de flujo de los pacientes según la estrategia de prevención y la presencia de infección o enfermedad por CMV. **Grupo RR:** Pacientes con replicación por CMV clínicamente relevante: Incluye a los pacientes con infección y enfermedad por CMV. **Grupo R no R:** Pacientes con replicación por CMV clínicamente no relevante: Representa a los pacientes que han tenido alguna determinación de antigenemia pp65 positiva sin confirmación posterior y sin presencia de síntomas de enfermedad por CMV. Esto no se acompañaba del inicio de antiviral o disminución de la inmunosupresión. **Grupo No R:** Pacientes sin replicación por CMV: Incluye pacientes que no desarrollaron replicación viral en ningún momento del seguimiento.

Los pacientes con replicación por CMV clínicamente no relevante fueron considerados como libres de infección por CMV en el análisis clínico de los datos, sin embargo fueron considerados como un grupo independiente en el análisis de los datos del estudio inmunológico (fase experimental).

La estrategia de prevención frente al CMV se administró en función del tratamiento inmunosupresor de inducción recibido y la combinación serológica del CMV entre el donante y el receptor. A nueve receptores seronegativos (R-) y treinta y siete seropositivos (R+) que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales se les administró profilaxis universal. Se utilizó valganciclovir como antiviral durante 3 meses en los receptores seropositivos y 6 meses en los seronegativos. A quince pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales (anti-IL2R, basiliximab) se les administró terapia anticipada.

El tratamiento de inmunosupresión inicial se basó en el riesgo inmunológico de cada paciente. Los pacientes con riesgo inmunológico bajo ( $PRA < 30\%$ ) recibieron anti-IL2R, esteroides, ácido micofenólico y tacrolimus y los de riesgo inmunológico elevado ( $PRA > 30\%$ ) o con tiempos de isquemia prolongados recibieron anticuerpos antilinfocitarios, esteroides, ácido micofenólico y tacrolimus.

#### **Otras variables clínicas analizadas:**

Se evaluaron, durante el primer año postrasplante, las siguientes variables: rechazo agudo, retraso en la función inicial del injerto, complicaciones quirúrgicas en los primeros 6 meses postrasplante, diabetes mellitus postrasplante e infecciones bacterianas (dichas variables están definidas en el apartado previo (H.1.) del estudio retrospectivo). Se analizó también la función renal (mediante creatinina sérica y proteinuria en 24 horas) y la supervivencia del paciente y del injerto al año y a los 5

años. En las tablas 4 y 5 se muestran las características demográficas de los receptores que recibieron terapia anticipada (tabla 5) y profilaxis universal (tabla 6).

Tabla 4: Características demográficas de los receptores seropositivos que recibieron terapia anticipada

	Infección / Enfermedad CMV (N=7)	No CMV (N=8)	p
<b>Receptores</b>			
Sexo (varones) – N (%)	3 (42,9)	7 (87,5)	ns
Edad – años (media $\pm$ ds)	46 $\pm$ 12,8	47,5 $\pm$ 6,9	ns
Técnica diálisis pre-Tx – N (%)			
Hemodiálisis	5 (71,4)	6 (75)	ns
Diálisis Peritoneal	1 (14,3)	0	
No diálisis previa	1 (14,3)	2 (25)	
Tiempo en diálisis – meses (mediana)	6,6	17,9	ns
Ig G CMV pre-Tx: R+ - N (%)	7 (100)	8 (100)	ns
<b>Donantes</b>			
Sexo (varones) – N (%)	3 (42,9)	4 (50)	ns
Edad – años (media $\pm$ ds)	47,1 $\pm$ 13,8	48,4 $\pm$ 9,8	ns
Cadáver vs. vivo – N (%)	2 (28,6) vs. 5 (71,4)	3 (37,5) vs. 5 (62,5)	ns
Ig G CMV – N (%)			
D+	7 (100)	6 (75)	ns
D-	0	2 (25)	
<b>Datos peritrasplante</b>			
Incompatibilidades HLA $\geq$ 3 – N (%)	6 (85,7)	7 (87,5)	ns
Inmunosupresión inducción – N (%)			
Anti-IL2R (basiliximab)	5 (71,4)	7 (87,5)	ns
Anticuerpos antilinfocitarios (1 dosis)	1 (14,3)	1 (12,5)	
No inducción	1 (14,3)	0	

Tabla 5: Características demográficas de los receptores seronegativos y seropositivos que recibieron profilaxis universal.

Receptores	R +			R -		
	Inf./Enfداد CMV N=12	No CMV N=25	p	Inf./Enfداد CMV N=5	No CMV N=4	p
Sexo (varones) – N (%)	9 (75)	14 (56)	ns	3 (60)	3 (75)	ns
Edad – años (media ± ds)	57,2 ± 7,9	57,4 ± 12,6	ns	59,2 ± 14,1	44,2 ± 9,8	ns
Técnica diálisis pre-Tx – N (%)						
Hemodiálisis	5 (41,7)	13 (52)		3 (60)	1 (25)	ns
Diálisis Peritoneal	7 (58,3)	11 (44)		1 (20)	2 (50)	
No diálisis previa	0	1 (4)		1 (20)	1 (25)	
Meses en diálisis – (mediana)	22,7	41,5	ns	31,8	63,3	ns
<b>Donantes</b>						
Sexo (varones) – N (%)	7 (58,3)	13 (52)	ns	3 (60)	1 (25)	ns
Edad – años (media ± ds)	51,9 ± 12,5	53,9 ± 15,5	ns	57,6 ± 15,1	52 ± 6,8	ns
Cadáver vs. vivo – N (%)	12 (100) vs. 0	25 (100) vs. 0		4 (80) vs. 1 (20)	3 (75) vs. 1 (25)	ns
Ig G CMV – N (%)						
D+	6 (50)	18 (72)	ns	4 (80)	4 (100)	ns
D-	1 (8,3)	3 (12)		0	0	
D desconocido	5 (41,7)	4 (16)		1 (20)	0	
<b>Datos peritrasplante</b>						
Incompatibilidades HLA ≥ 3 – N (%)	11 (91,7)	23 (92)	ns	4 (80)	4 (100)	ns
Inmunosupresión inducción - N (%)						
Anti-IL2R (basiliximab)	0	0	ns	2 (20)	1 (25)	ns
Anticuerpos antilinfocitarios	12 (100)	25 (100)		3 (60)	3 (75)	

## Métodos: Fase experimental

Se realizó una monitorización inmunológica de los pacientes durante los dos primeros años postrasplante. Se tomaron muestras de sangre antes del trasplante (basal) y a los 6, 12 y 24 meses. En cada momento se extrajeron 20 ml de sangre periférica en tubos con EDTA como anticoagulante y se utilizaron en los ensayos que se detallan a

continuación. Los análisis se realizaron a medida que los pacientes se fueron incorporando al estudio.

## **Monitorización inmunológica**

### **A) Expresión de IFN- $\gamma$ en las poblaciones linfocitarias T en respuesta a antígenos virales.**

#### **Estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) *in vitro***

Las PBMCs se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll/Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala). La estimulación *in vitro* de las PBMCs se realizó según los protocolos descritos previamente por Zhou et al<sup>151</sup>. Brevemente, se cultivaron  $2 \times 10^6$  PBMCs, previamente aislados en gradiente de densidad, en 0,5 ml de medio de cultivo RPMI (Lonza) y 10% de suero fetal bovino (FCS) con librerías de péptidos correspondientes a los antígenos virales pp65 e IE-1 (ProMix<sup>TM</sup>, ProImmune, Oxford, UK) (1  $\mu$ g/ml). Como control negativo de producción de IFN- $\gamma$  se utilizó una librería de péptidos correspondientes a beta-actina humana (ProMix<sup>TM</sup>, ProImmune, Oxford, UK) (1 mg/ml) y como control positivo enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB, Sigma-Aldrich).

A continuación, se añadió 1  $\mu$ g/ml de los anticuerpos coestimuladores: anti-CD28 y anti-CD49d (Miltenyi) y las células se incubaron a 37°C de temperatura en estufa con atmósfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>, en tubos Falcon 2025 (BD Biosciences). Tras 2 horas de cultivo, se añadió brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich) en 0,5 ml de medio de cultivo (2  $\mu$ M, concentración final) y se dejó incubar durante la noche para el bloqueo del tráfico de vesículas intracelulares y evitar la secreción de

citoquinas (IFN- $\gamma$ ) al medio. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en células T CD8 y CD4 mediante citometría de flujo (Figura 12).

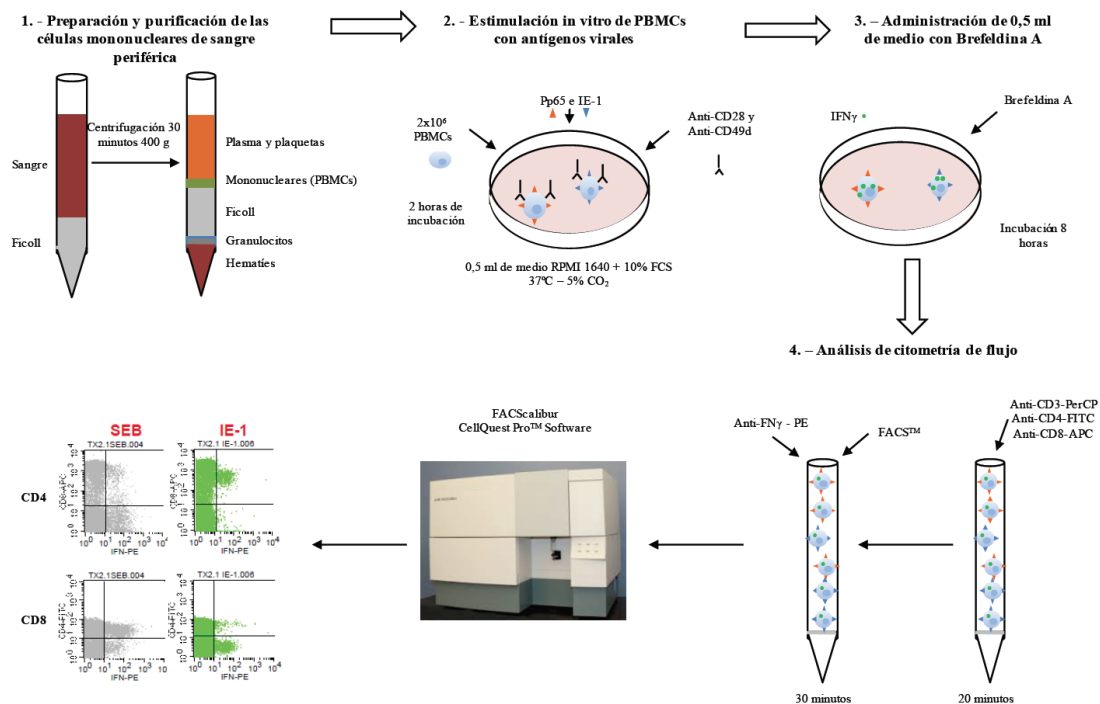


Figura 12: Preparación y estimulación de las células mononucleares de sangre periférica para el análisis mediante citometría de flujo de los linfocitos T CD4 y CD8 específicos frente a los antígenos virales de CMV.

### Análisis de la expresión de IFN- $\gamma$ en células T mediante citometría de flujo

Tras la estimulación nocturna de las células mononucleares con los antígenos virales las células se lavaron varias veces en una solución salina (PBS) para eliminar los restos del cóctel de estimulación. A continuación las células se incubaron con los anticuerpos de la estirpe linfoide T anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC y anti-CD8-APC durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente las células fueron fijadas en la solución comercial BD citofix (Beckton Dickinson) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación las células fueron permeabilizadas con



la solución comercial FACS<sup>TM</sup> solución de permeabilización 2 de Beckton Dickinson durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente las células fueron incubadas con anti-IFN- $\gamma$ -PE durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Paralelamente, la mitad de la muestra se incubó con anticuerpo control IgG1-PE. Todos los anticuerpos utilizados en este estudio se compraron en el laboratorio Miltenyi Biotec. El análisis se realizó en un citómetro FACScalibur (BD) y se analizó con CellQuest Pro<sup>TM</sup> Software (BD). Al menos 100.000 eventos fueron recogidos en cada análisis.

## **B) Inmunidad innata**

### **Expresión de receptores de la familia NKG2 en células NK y células T.**

Mediante citometría de flujo directa se analizó la expresión de NKG2C, NKG2A, NKG2D en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (población CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y en células NK (población CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>).

Se obtuvieron PBMCs a partir de sangre anticoagulada con EDTA mediante centrifugación en gradiente de densidad y posteriormente estas células fueron teñidas con los anticuerpos correspondientes: anti-CD3-PerCP, anti CD8-FITC, anti CD4-APC para el estudio de los LT CD8 y anti CD56-FITC para las células NK como previamente se ha descrito. Los anticuerpos empleados para estudiar el repertorio de receptores de la familia NKG2 fueron anti-NKG2C-PE, anti-NKG2A-PE, anti-NKG2D-PE. El fenotipo de las poblaciones se evaluó en células T CD8 y en células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo multiparamétrica convencional de cuatro colores.

La Figura 13 muestra un ejemplo del análisis de la frecuencia de células que expresan el receptor activador NKG2C o el receptor inhibidor NKG2A en linfocitos T (células CD3<sup>+</sup>) (Fig. 13A) y células NK (células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) (Fig. 13B). Debido a que todos los linfocitos T CD8 y todas las células NK expresan el receptor activador

NKG2D, la expresión de este receptor se evaluó como intensidad media de fluorescencia (MFI) en la población CD3+CD4- (linfocitos T CD8) (Fig. 13A) o en linfocitos CD3-CD56+ (células NK) (Fig. 13B).

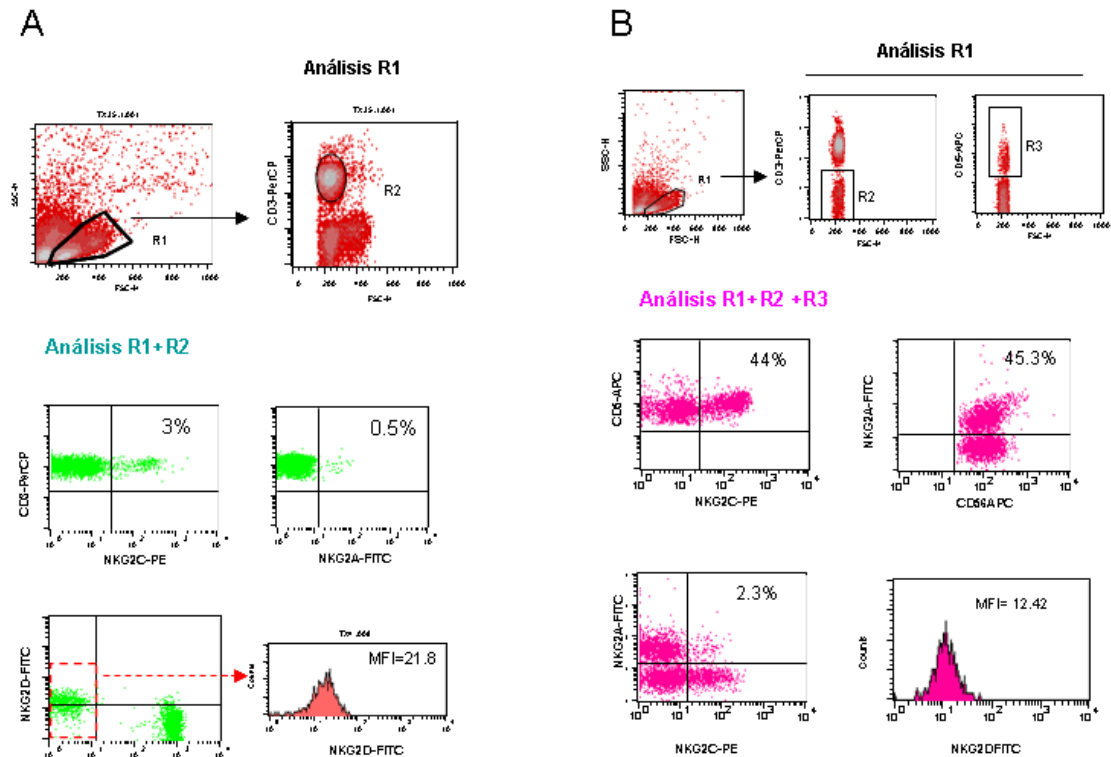


Figura 13: Estrategia para el análisis de subpoblaciones de leucocitos mediante citometría de flujo. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de sangre anticoagulada con EDTA mediante centrifugación en gradiente de ficoll. El fenotipo de las poblaciones se evaluó en PBMCs mediante tinción con anticuerpos y técnicas convencionales de citometría de flujo.

### Análisis estadístico

Se realizó con el programa estadístico SPSS y el programa Graphpad.

La descripción de las variables cuantitativas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico (RIC). Se empleó el test Chi cuadrado para estudiar la asociación entre variables cualitativas y el test U Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para las variables cuantitativas.

Se realizó un análisis de supervivencia del injerto en función de la replicación viral por el método de Kaplan-Meier. Se compararon las curvas de supervivencia con la prueba del Log-rank.

Se realizó un análisis de curvas ROC con el test de Youden para estimar el valor de corte de la frecuencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  asociado con la mejor especificidad y sensibilidad para predecir replicación viral postrasplante.

El resultado de los análisis se consideró estadísticamente significativo cuando la  $p < 0,05$ .



## **RESULTADOS**



## 1. – ESTUDIO RETROSPECTIVO CLÍNICO

### Infección / enfermedad por CMV

Se incluyeron 377 pacientes, con una mediana de tiempo de seguimiento de 8 años postrasplante (RIC 3,7 meses – 15,9 años). La incidencia acumulada, en el primer año, de infección por CMV fue del 34,7% (N=131) y de enfermedad del 9,5% (N=36) (todos síndromes virales). En el resto de pacientes (55,7%, N=210) no se observó replicación de CMV.

Tabla 6: Características demográficas de los receptores según la replicación viral postrasplante.

Receptores	CMV si (N=167)	CMV no (N=210)	p
Edad – años ( $\bar{x} \pm ds$ )	50,5 $\pm$ 13,2	47 $\pm$ 13,2	0,006
Sexo varón – N (%)	107 (64,1)	137 (65,2)	ns
Etiología ERC – n (%)			
Diabetes mellitus	11 (6,8)	8 (3,8)	ns
No diabetes mellitus	156 (93,2)	201 (96,2)	
Técnica diálisis pre-Tx – N (%)			
Hemodiálisis	97 (58,1)	112 (53,3)	ns
Diálisis Peritoneal	68 (40,7)	90 (42,9)	
No diálisis pre-Tx	2 (1,2)	8 (3,8)	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> ) – (ds)	24,9 (3,72)	24,7 (4,5)	ns
Meses en diálisis ( $\bar{x} \pm ds$ )	31 $\pm$ 30,4	36 $\pm$ 52,6	ns
HTA pre-Tx – N (%)	121 (73,8)	154 (77,8)	ns
Diabetes mellitus pre-Tx – N (%)	17 (10,2)	14 (7,1)	ns

x: media, ds: desviación estándar, ERC: enfermedad renal crónica, Tx: trasplante, IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión arterial.

En las tablas 6 y 7 se muestran las características demográficas de los receptores y de los donantes, así como los datos peri-trasplante en base a la presencia de infección/enfermedad por CMV durante el primer año postrasplante. No hubo

diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos salvo la edad mayor de los receptores y donantes en el grupo de pacientes con replicación viral postrasplante.

Tabla 7: Características demográficas de los donantes y datos peri-trasplante según la replicación viral postrasplante.

Donantes	CMV si (N=167)	CMV no (N=210)	p
Edad – años (x±ds)	49,4 ± 13,3	45 ± 14,7	0,003
Sexo varón – N (%)	100 (60,2)	131 (63,9)	ns
Datos peritrasplante	CMV si (N=167)	CMV no (N=210)	p
Serología CMV – N (%)			
R + / D +	123 (73,6%)	145 (69%)	ns
R + / D -	14 (8,4%)	33 (15,7%)	
R - / D +	29 (17,4%)	22 (10,5%)	
R - / D -	1 (0,6%)	10 (4,8%)	
IS de inducción – N (%)			
Anti-IL2R (basiliximab)	80 (47,9)	101 (48,1)	ns
OKT3	16 (9,6)	35 (16,7)	
Acs anti-linfocitarios	6 (3,6)	6 (2,9)	
No inducción	65 (38,9)	68 (32,4)	
IS de mantenimiento – N (%)			
Tacrolimus	114 (68,3)	163 (77,6)	ns
Ciclosporina	51 (30,5)	47 (22,4)	
Rapamicina	2 (1,2)	-	
RFI – N (%)	32 (20,8)	27 (12,9)	ns
Rechazo agudo – N (%)	35 (21)	33 (15,7)	ns
Complicaciones quirúrgicas – N (%)	33 (19,9)	35 (16,7)	ns

x: media, ds: desviación estándar, IS: inmunosupresión, RFI: retraso en la función inicial del injerto (necesidad hemodiálisis en la primera semana)

En la tabla 8 se muestra la incidencia de infección y enfermedad por CMV y la incidencia de no replicación viral teniendo en cuenta la estrategia de prevención utilizada así como el fármaco antiviral. La incidencia de enfermedad por CMV se



presentó con más frecuencia en los pacientes que recibieron profilaxis universal, aunque no fue estadísticamente significativo (PU: 12,4%, N=15 vs. TA: 8,2%, N=21, p=0,19) y el uso de valganciclovir disminuyó la incidencia de enfermedad por CMV en ambas estrategias de prevención comparado con ganciclovir. La incidencia de infección por CMV fue más alta en los pacientes con terapia anticipada que con profilaxis universal y el cambio de antiviral no mostró grandes diferencias.

Tabla 8: Incidencia acumulada, en el primer año, de infección y enfermedad por CMV

	Profilaxis con ganciclovir (N=78)	Profilaxis con valganciclovir (N=43)	Terapia anticipada con ganciclovir (N=128)	Terapia anticipada con valganciclovir (N=128)	p
Infección por CMV N (%)	23 (29,5)	14 (32,5)	44 (34,4)	54 (42,2)	ns
Enfermedad por CMV N (%)	12 (15,4)	3 (7)	14 (10,9)	7 (5,5)	ns
No replicación viral N (%)	43 (55,1)	26 (60,5)	70 (54,7)	67 (52,3)	ns

La infección por CMV (N = 131) se presentó de media a los  $2,4 \pm 1,9$  meses después del trasplante (RIC 0,5-12 meses). El tratamiento en estos casos fue variable: El 52,7% (N=69) se trató con la combinación de antiviral oral y reducción o suspensión del tratamiento con MMF, el 19,8% (N=26) sólo con antiviral oral y el 24,4% (N=32) sólo con reducción o suspensión temporal del tratamiento con MMF. A cuatro pacientes (3,1%) con infección por CMV (antigenemia entre 10-15 células por  $2 \times 10^5$  leucocitos en más de 2 tests consecutivos) se les realizó un seguimiento virológico estrecho y no recibieron tratamiento específico debido a la negativización de la antigenemia en los controles sucesivos. La infección por CMV recurrente se presentó en 13 pacientes (9,9%).

La enfermedad por CMV (N = 36) se presentó de media a los 2 meses (RIC 1-36 meses) después del trasplante. El tratamiento consistió en antiviral y reducción del tratamiento con MMF en la mayoría de los pacientes (94,4%, N=34): 23 pacientes fueron tratados con ganciclovir iv inicialmente y posteriormente continuaron con tratamiento antiviral oral y 11 pacientes fueron tratados con antiviral oral. A dos pacientes se les trató la enfermedad reduciendo el tratamiento con MMF. El 19,9% (N=7) de los pacientes presentaron enfermedad por CMV recurrente. No se detectó ningún caso de resistencia al tratamiento con ganciclovir o valganciclovir.

Tabla 9: Análisis de factores de riesgo de infección/enfermedad por CMV.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Edad receptor, por año	1,01	1,01-1,03	0,00	1,02	1,008-1,03	0,00
CMV D+/R-	2,27	1,19-4,32	0,01	2,46	1,28-4,73	0,00
CMV D+/R+	2,04	1,17-3,55	0,01	1,89	1,08-3,29	0,02
Ganciclovir vs. Valganciclovir	1,08	0,79-1,47	0,61			
Diabetes Mellitus	1,31	0,78-2,21	0,29			
IMC receptor (kg/m <sup>2</sup> )	1,01	0,97-1,05	0,46			
Tipo donante (vivo vs. cadáver)	0,75	0,35-1,61	0,46			
Inmunosupresión (Tacro vs. CyA)	0,64	0,46-0,89	0,00	1,51	1,08-2,09	0,01
Meses diálisis pre-Tx	0,99	0,99-1,00	0,34			
Rechazo agudo (por biopsia)	11,34	0,95-1,90	0,09			

Los factores predictores de infección/enfermedad por CMV se muestran en la tabla 9. La edad del receptor y la combinación serológica frente al CMV entre el donante y el receptor se asociaron de forma significativa con una mayor tasa de replicación viral. El modelo de regresión de Cox confirmó que la combinación

serológica D+/R- era la que mayor riesgo de infección/enfermedad por CMV presentaba, siendo el riesgo 2,46 veces mayor que los pacientes seropositivos. Así mismo el tratamiento con tacrolimus aumentaba el riesgo de infección/enfermedad por CMV 1,5 veces más que los pacientes tratados con ciclosporina. El antiviral empleado no mostró diferencias en el riesgo de infección o enfermedad por CMV.

### **Eventos clínicos postrasplante (efectos indirectos del CMV)**

Los pacientes con infección/enfermedad por CMV presentaron una tendencia mayor a desarrollar enfermedad cardiovascular postrasplante (grupo CMV: N=33, 19,8% vs. grupo No CMV N=24, 11,6%,  $p=0,06$ ) y diabetes mellitus postrasplante (grupo CMV: N=47, 28,3% vs. grupo No CMV: N=41, 19,8%,  $p=0,05$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en infecciones bacterianas y neoplasias post-trasplante.

El 21% (N=35) de los pacientes con infección/enfermedad por CMV presentaron rechazo agudo por biopsia renal vs. el 15,7% (N=33) de los pacientes sin infección/enfermedad por CMV ( $p=0,18$ ).

### **Supervivencia del paciente y predictores de mortalidad**

Sesenta pacientes (15,9%) fallecieron a lo largo del periodo de seguimiento (44 pacientes murieron con injerto funcionante y 16 pacientes tras la pérdida del injerto, estando en diálisis).

Treinta y tres pacientes (8,7%) tuvieron infección por CMV y veintisiete (7,2%) no tuvieron replicación viral. Las causas de muerte fueron similares en los dos grupos: de causa cardiovascular fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 7 en el grupo no CMV, de causa infecciosa fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 2 en el grupo no

CMV y de causa neoplásica fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 9 en el grupo no CMV. Por otras causas fallecieron 5 en el grupo CMV y 3 en el grupo no CMV.

En la Fig. 14 se muestra el análisis de supervivencia del paciente a largo plazo. Ésta fue significativamente superior en los pacientes que no tuvieron infección/enfermedad por CMV (grupo CMV: 64,2% vs. grupo no CMV: 76,9% a los 15,8 años,  $p=0,019$ ).

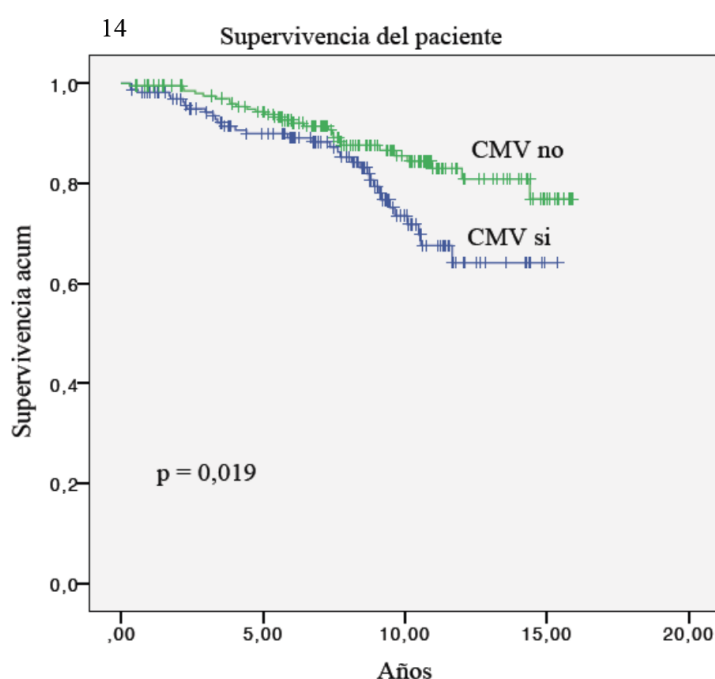


Figura 14: Supervivencia del paciente según la presencia o ausencia de replicación viral postrasplante. La supervivencia del paciente fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV.

Cuando se analizó la supervivencia teniendo en cuenta la estrategia de prevención utilizada, vimos que la supervivencia del paciente fue significativamente superior sólo en los pacientes que recibieron profilaxis universal y que no tuvieron infección/enfermedad por CMV (57,2% grupo CMV + profilaxis universal vs. 81% grupo no CMV + profilaxis universal a los 14 años,  $p=0,03$ ) (Fig. 15A).

Los pacientes que recibieron terapia anticipada no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del paciente tuvieran o no infección/enfermedad por CMV (67,7% grupo CMV + terapia anticipada vs. 72,6% grupo no CMV + terapia anticipada a los 15,3 años,  $p=0,178$ ) (Fig. 15B).

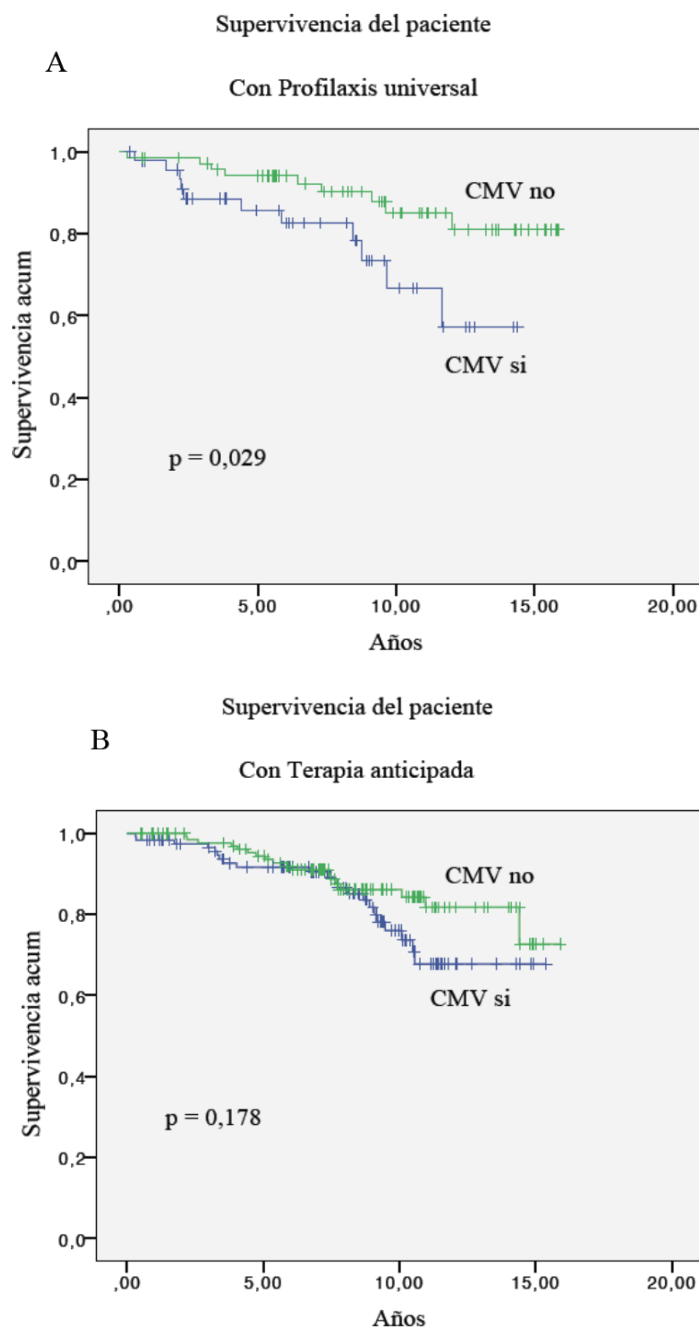


Figura 15: Supervivencia del paciente según la presencia o ausencia de replicación viral postrasplante y la estrategia de prevención utilizada. La supervivencia del paciente fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV y recibieron profilaxis universal (A). Los pacientes con terapia anticipada presentaron una supervivencia del paciente similar en ambos grupos (B).

El análisis de posibles factores asociados al riesgo de mortalidad se realizó por duplicado, por un lado considerando la infección y enfermedad por CMV como variable agregada (Tabla 10 - Modelo 1) y por otro lado teniendo en cuenta de manera separada la infección de la enfermedad CMV (Tabla 11 - Modelo 2).

Tabla 10 – Modelo 1: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable agregada.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Infección + Enfdd por CMV	1,74	1,04-2,89	0,033	1,29	0,70-2,38	0,4
Edad receptor, por año	1,07	1,05-1,1	<0,001	1,09	1,05-1,13	<0,001
Diabetes Mellitus	3,99	2,09-7,58	<0,001	1,38	0,53-3,58	0,5
IMC receptor	1,14	1,07-1,21	<0,001	1,08	1,01-1,17	0,02
Edad donante, por año	1,026	1,006-1,04	0,009	0,98	0,96-1,01	0,30
Tiempo de isquemia fría	1,04	1,001-1,08	0,045	1,07	1,02-1,11	0,002
Función inicial del injerto	0,58	0,34-0,97	0,038	1,03	0,5-2,1	0,93
Enfermedad cardiovascular	1,69	0,95-3,01	0,07	0,93	0,46-1,89	0,84
Pérdida del injerto	2,85	1,6-5,07	<0,001	2,78	1,3-5,92	0,008

En el modelo 1 (tabla 10): El análisis de Cox mostró que, ajustado por variables relacionadas con la mortalidad, la infección y enfermedad por CMV (como variable agregada) no se asocia con un mayor riesgo de mortalidad a largo plazo HR 1,29 (p=0,4 IC 95% 0,7-2,38).

En el modelo 2 (tabla 11): El análisis de Cox mostró que ni la enfermedad por CMV ni la infección por CMV, analizadas como variables desagregadas, influyen en la supervivencia a largo plazo del paciente (Enfermedad por CMV: HR: 1,26,  $p = 0,598$ , IC 95% 0,52-3,04; Infección por CMV: HR: 1,26,  $p = 0,49$ , IC 95% 0,64-2,49). Las variables que sí influyen en la supervivencia del paciente son la edad e índice de masa corporal del receptor y la pérdida del injerto.

Tabla 11 – Modelo 2: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo considerando a la infección y enfermedad por CMV como variable desagregada.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Enfermedad CMV	2,53	1,25-5,11	0,009	1,26	0,52-3,04	0,598
Infección CMV	1,60	0,91-2,82	0,10	1,26	0,64-2,49	0,49
Edad receptor, por año	1,07	1,05-1,1	<0,001	1,09	1,05-1,13	<0,001
Diabetes Mellitus	3,99	2,09-7,58	<0,001			
IMC receptor	1,14	1,07-1,21	<0,001	1,08	1,01-1,17	0,03
Edad donante, por año	1,026	1,01-1,04	0,009			
Tiempo de isquemia fría	1,04	1,00-1,08	0,045	1,01	0,95-1,07	1,01
Función inicial del injerto	0,58	0,34-0,97	0,038	1,05	0,52-2,15	0,87
Enfermedad cardiovascular	1,69	0,95-3,01	0,07	1,08	0,52-2,22	0,83
Pérdida del injerto	2,85	1,6-5,07	0,001	3,00	1,42-6,35	0,004

## Supervivencia del injerto y predictores de pérdida del injerto

Los pacientes con infección/enfermedad por CMV perdieron el injerto renal con mayor frecuencia que los pacientes que no presentaron CMV: 30 (18%) vs. 26 (12,4%), respectivamente. Las causas de pérdida del injerto fueron similares en los dos grupos: En el grupo CMV se perdió el injerto por rechazo agudo en 4 casos, rechazo crónico en 21 casos, recidiva de enfermedad de base en 1 caso y otras causas en 4 casos. En el grupo no CMV las causas fueron: rechazo agudo en 2 casos, rechazo crónico en 18 casos, recidiva de enfermedad de base en 2 casos y por otras causas en 4 casos.

En la figura 16 se muestra la supervivencia del injerto a largo plazo, que fue significativamente superior en los pacientes sin infección/enfermedad por CMV (grupo CMV: 68% vs. grupo no CMV: 74,1% a los 15,8 años,  $p=0,034$ ).

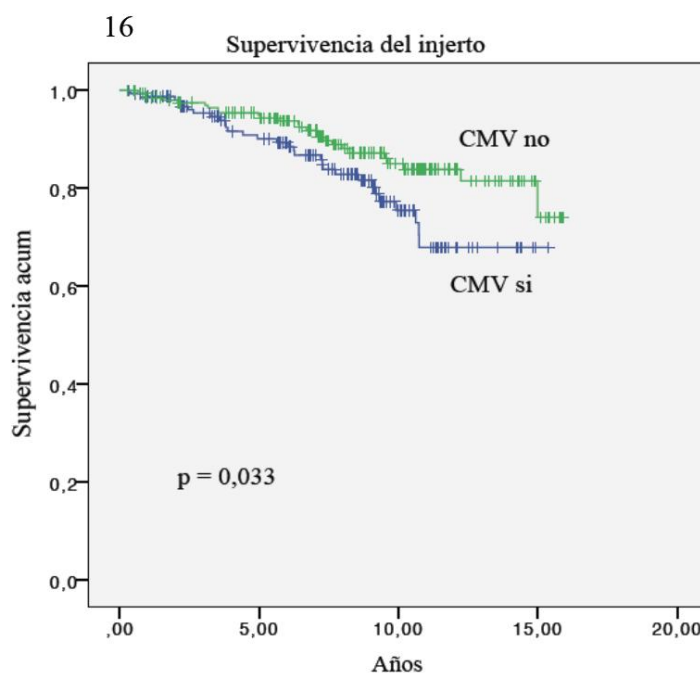


Figura 16: Supervivencia del injerto según la presencia o ausencia de replicación viral postrasplante. La supervivencia del injerto fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV.



Cuando se analizó la supervivencia teniendo en cuenta la estrategia de prevención utilizada (figura 17A) vimos que de nuevo la supervivencia del injerto fue significativamente superior sólo en los pacientes que recibieron profilaxis universal y no tuvieron infección/enfermedad por CMV (36,6% grupo CMV + profilaxis universal vs. 77,2% grupo CMV no + profilaxis universal a los 14,3 años,  $p=0,001$ ), no habiendo diferencias estadísticamente significativa en la supervivencia del injerto entre los pacientes con o sin infección/enfermedad por CMV que recibieron terapia anticipada (82,6% grupo CMV + terapia anticipada vs. 55,2% grupo CMV no + terapia anticipada,  $p=0,84$ ) (Fig. 17B).

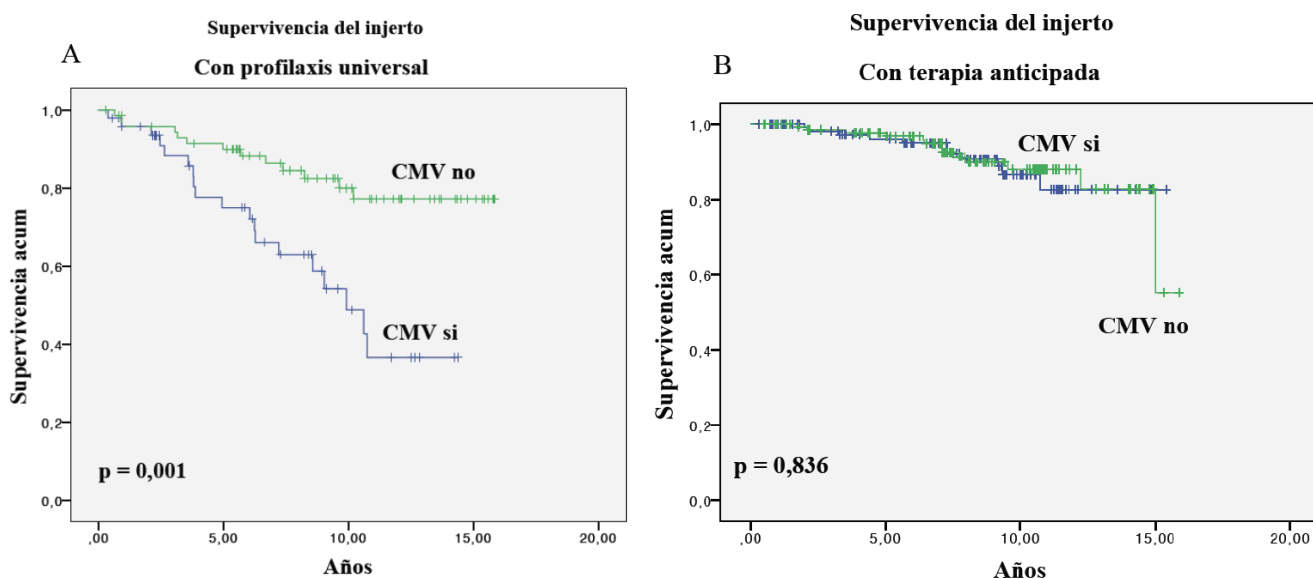


Figura 17: Supervivencia del injerto según la presencia o ausencia de replicación viral postrasplante y la estrategia de prevención utilizada. La supervivencia del injerto fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV y recibieron profilaxis universal (A). Los pacientes con terapia anticipada presentaron una supervivencia del injerto similar en ambos grupos (B).

El análisis de posibles factores de riesgo asociados a la pérdida del injerto se realizó por duplicado de igual forma que para la mortalidad. Por un lado se consideró la infección y enfermedad por CMV como variable agregada (Tabla 12 - Modelo 1) y por otro lado se consideraron como variables desagregadas (Tabla 13 - Modelo 2).

Tabla 12 – Modelo 1: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable agregada.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Infección + Enfda CMV	1,8	1,06-3,06	0,029	1,92	1,03-3,36	0,023
Edad receptor, por año	0,96	0,94-0,98	0,002	0,95	0,93-0,98	0,001
Diabetes Mellitus	1,68	0,66-4,27	0,27			
IMC receptor	1,03	0,96-1,11	0,36			
Edad donante, por año	1,01	0,99-1,03	0,1			
Tiempo de isquemia fría	1,04	1,01-1,09	0,028	1,05	1,00-1,09	0,046
Función inicial del injerto	2,03	1,2-3,44	0,008	1,54	0,83-2,84	0,16
Rechazo agudo (por biopsia)	1,8	1,03-3,13	0,038	2,44	1,33-4,47	0,004
Profilaxis Universal	2,8	1,64-4,76	<0,001	1,85	1,03-3,34	0,039
Complicaciones quirúrgicas	1,8	1,06-3,06	0,029	2,17	1,21-3,91	0,01

En el modelo 1 (tabla 12): El análisis de Cox mostró que, ajustado por variables relacionadas con la pérdida del injerto, la infección/enfermedad por CMV (como variable agregada) está asociada con un mayor riesgo de pérdida del injerto: HR 1,92 (p=0,023 IC 95% 1,03-3,36).

En el modelo 2 (tabla 13): El análisis de Cox mostró que se sigue detectando un efecto significativo de la enfermedad por CMV y también de la infección por CMV en el riesgo de pérdida del injerto, aunque ésta última no cumple los estándares de significación estadística. (Enfermedad CMV: HR 2,6; p=0,014 IC 95% 1,2-5,8. Infección CMV: HR 1,7; p=0,09 IC 95% 0,9-3,3).

Tabla 13 – Modelo 2: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo considerando la infección y enfermedad por CMV como variable desagregada.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Enfermedad por CMV	2,70	1,33-5,48	0,006	2,60	1,21-5,85	0,014
Infección por CMV	1,46	0,80-2,65	0,21	1,73	0,91-3,29	0,094
Edad receptor, por año	0,96	0,94-0,98	0,002	0,96	0,93-0,98	0,001
Tiempo de isquemia fría	1,04	1,00-1,09	0,028	1,05	1,012-1,10	0,012
Rechazo agudo (por biopsia)	1,8	1,03-3,13	0,038	2,57	1,38-4,77	0,003
Profilaxis Universal	2,8	1,64-4,76	<0,001	1,77	0,98-3,20	0,057
Complicaciones quirúrgicas	1,8	1,06-3,06	0,029	2,17	1,19-3,94	0,011



## 2. – ESTUDIO PROSPECTIVO

Este estudio consta de una fase clínica y otra experimental. Los resultados de cada fase se presentan de forma unificada en función de si el paciente recibió terapia anticipada o profilaxis universal como estrategia de prevención frente al CMV.

### Pacientes con terapia anticipada

Analizamos quince pacientes seropositivos para CMV, con riesgo intermedio de replicación viral postrasplante y que recibieron terapia anticipada (véase figura 10 del apartado H.2., página 77).

#### Fase Clínica

##### **Infección / enfermedad por CMV**

La incidencia acumulada, en el primer año postrasplante, de infección por CMV fue del 40% (N=6) y de enfermedad por CMV del 6,66% (N=1, síndrome viral). La replicación viral se presentó de media a los  $2,7 \pm 0,7$  meses después del trasplante (rango 2-4 meses).

Estos siete pacientes fueron tratados con valganciclovir oral, con dosis ajustadas según la función renal, y a cinco de ellos además se les disminuyó la inmunosupresión, que consistió en disminución de la dosis de ácido micofenólico. Se consiguió la remisión virológica, definida como 2 tests de antigenemia pp65 consecutivos negativos, a los 40 días de media después de haber iniciado el tratamiento antiviral. No se detectaron casos de resistencia al tratamiento con valganciclovir y un paciente tuvo infección recurrente.

Los ocho pacientes restantes no presentaron signos o síntomas de infección o enfermedad por CMV a lo largo del primer año. Cinco de ellos no presentaron replicación viral en ningún momento postrasplante mientras que tres de ellos sí que

mostraron algún valor de antigenemia pp65  $\leq$  a 2 células por  $2 \times 10^5$  leucocitos que no se confirmó en los siguientes tests realizados. Estos ocho pacientes fueron considerados libres de infección por CMV.

### Eventos clínicos postrasplante

Los pacientes con infección por CMV presentaron de forma significativa, en el primer año, más diabetes mellitus que los pacientes que no tuvieron infección o enfermedad por CMV. También presentaron más episodios de rechazo agudo e infecciones bacterianas que requirieron ingreso hospitalario, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 14).

Tabla 14: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes seropositivos según la replicación viral.

	CMV si (N=7)	CMV no (N=8)	p
Rechazo agudo por biopsia– N (%)	2 (28,6)	0	ns
Infecciones con ingreso – N (%)	4 (57,1)	1 (12,5)	ns
Diabetes mellitus de novo – N (%)	3 (42,9)	0	0,038
Complicaciones quirúrgicas – N (%)	1 (14,3)	0	ns
Retraso función inicial injerto – N (%)	1 (14,3)	0	ns

Los episodios de rechazo agudo aparecieron en 2 pacientes, en uno de ellos la replicación viral precedió el episodio de rechazo mientras que en el otro el rechazo ocurrió antes de la reactivación viral.

La función renal y la proteinuria al año y los 5 años no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes. Los pacientes con infección por CMV presentaron una supervivencia del injerto a los 5 años inferior que la de los pacientes sin replicación viral, aunque esta diferencia no fue estadísticamente

significativa (Tabla 15). La supervivencia del paciente fue del 100% en los dos grupos de pacientes a los cinco años.

Tabla 15: Función renal y supervivencia del paciente y del injerto en pacientes seropositivos según la replicación viral CMV postrasplante.

	CMV si (N=7)	CMV no (N=8)	p
Creatinina (mg/dl) ( $x \pm ds$ )			
1 año	$1,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,3$	ns
5 años	$1,4 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,4$	
Proteinuria (gr. 24 horas) ( $x \pm ds$ )			
1 año	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	ns
5 años	$0,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,2$	
Supervivencia del injerto (%)			
1 año	71,4	100	ns
5 años	71,4	100	
Supervivencia del paciente (%)			
1 año	100	100	ns
5 años	100	100	

### Fase Experimental: Monitorización inmunológica

#### A) Respuesta inmune celular específica de CMV

En primer lugar, confirmamos en una pequeña serie de individuos sanos y de muestras pre-trasplante de pacientes, que los individuos seronegativos para CMV no mostraban una respuesta inmune específica frente a los antígenos virales IE-1 y pp65 (fig. 18A). Por otro lado, como era de esperar, los donantes sanos seropositivos para CMV sí presentaban respuesta inmune a ambos péptidos virales (fig. 18B). Sin embargo, en un grupo de pacientes seropositivos con enfermedad renal crónica observamos que, a pesar de tener la serología positiva para CMV y una respuesta positiva para el estímulo policlonal con la enterotoxina B del *Staphylococcus aureus*, no presentaban inmunidad celular específica frente al antígeno IE-1 (fig. 18C). Estos pacientes desarrollaron infección por CMV postrasplante y en las muestras analizadas al año vimos cómo fueron capaces de desarrollar una respuesta inmune específica potente tras la replicación viral (fig. 18D).

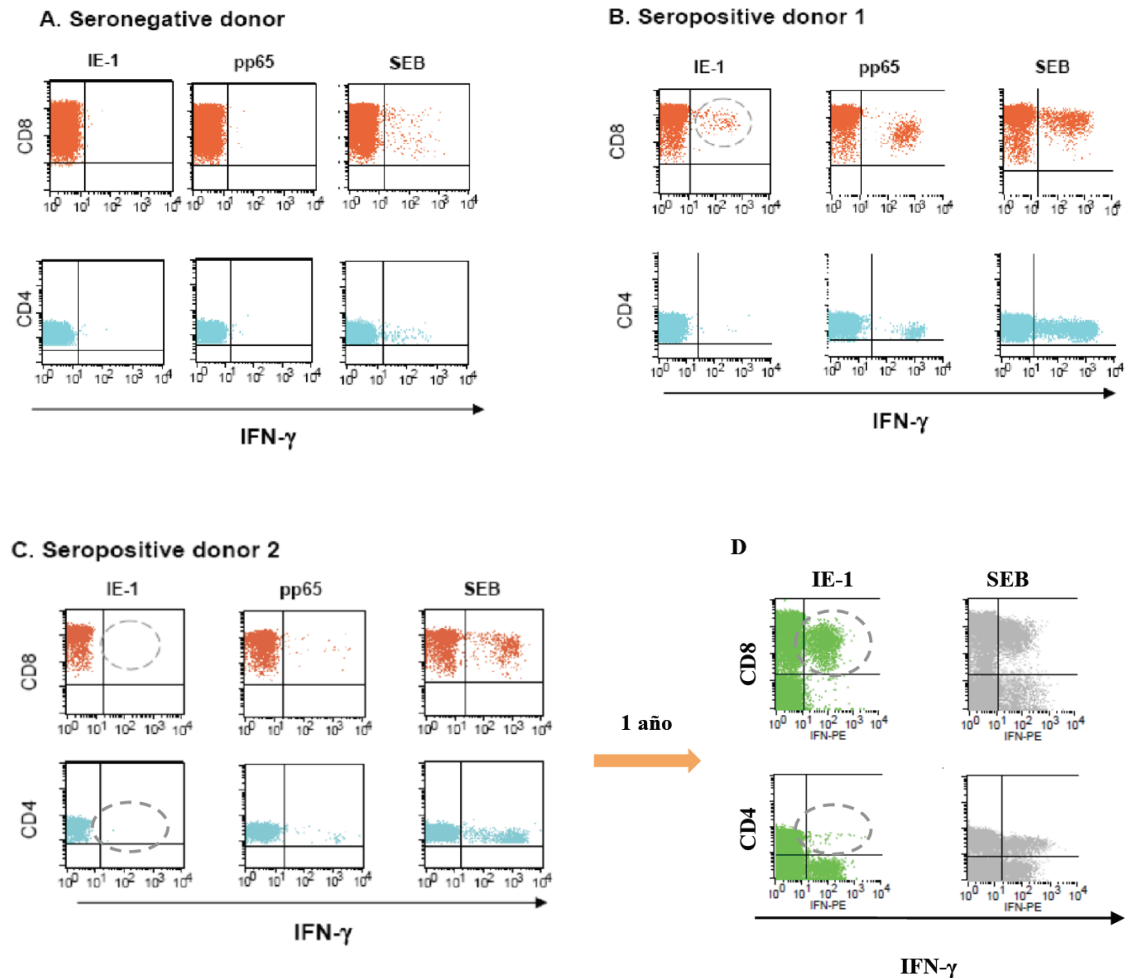


Figura 18: Análisis de la producción de IFN- $\gamma$  mediante citometría de flujo intracelular en células T CD3+CD8+ y CD3+CD4+ de un individuo sano seronegativo para CMV (A), de un individuo sano seropositivo (B) y en una muestra pre-trasplante de uno de los pacientes con insuficiencia renal crónica seropositivos para CMV (C y D). En A, el individuo seronegativo no presenta respuesta inmune T CD8 ni CD4 frente a los antígenos virales IE-1 y pp65, mientras que sí presenta respuesta T frente al estímulo con la enterotoxina B del *Staphylococcus aureus*. En B, el individuo seropositivo para CMV presenta respuesta inmune T CD8 frente a IE-1 y pp65 así como respuesta frente al estímulo con la enterotoxina B del *Staphylococcus Aureus*. La respuesta T CD4 a IE-1 y pp65 aunque presente, es mucho menos intensa que la de CD8. En el paciente seropositivo para CMV (C), la respuesta inmune T CD8 y CD4 frente a IE-1 y pp65 está ausente o es muy escasa, mientras que la respuesta frente al estímulo con la enterotoxina B del *Staphylococcus Aureus* se mantiene presente. En D, este mismo paciente al año postrasplante presenta una potente respuesta CD8 a IE-1 tras el episodio de infección viral postrasplante.

Posteriormente analizamos en los 15 pacientes trasplantados de riñón, con un riesgo intermedio de replicación viral y que recibieron terapia anticipada la respuesta inmune a los antígenos virales IE-1 y pp65 en muestras pre-trasplante, al mes, 6 y 12 meses postrasplante. Encontramos que, en muestras pre-trasplante, la respuesta celular



T CD8 al antígeno IE-1 fue significativamente superior en pacientes que no desarrollaron infección o enfermedad por CMV en el primer año postrasplante comparado con la respuesta inmune pretrasplante de los pacientes que sí presentaron replicación viral (figura 19A).

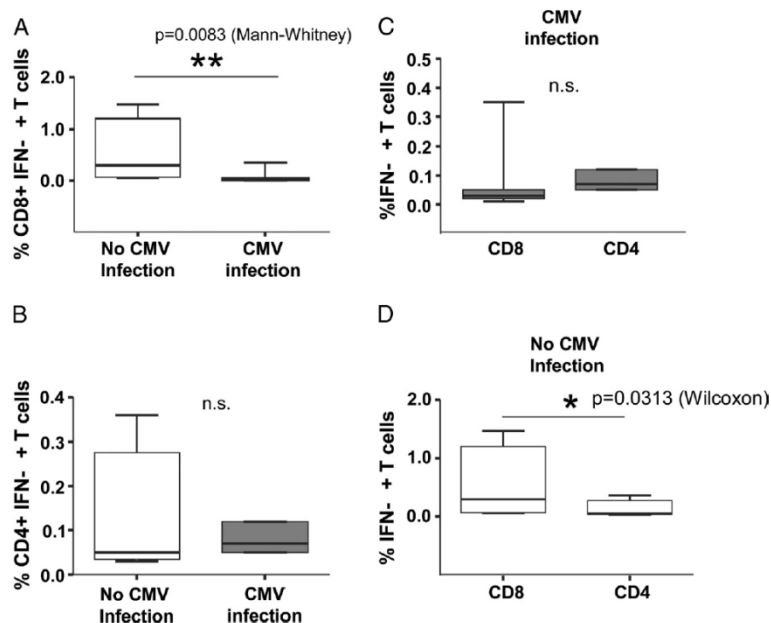


Figura 19: Respuesta celular T frente al antígeno viral IE-1 en muestras pre-trasplante. Aislamos células mononucleares de sangre periférica de pacientes que recibieron un injerto renal y fueron estimuladas y cultivadas in vitro con el antígeno viral IE-1. Mediante citometría de flujo detectamos la frecuencia de células T CD8 y CD4 productoras de IFN- $\gamma$  en linfocitos CD3 seleccionados. A) Respuesta (mediana, percentiles 75 y 25 y SEM) de células T CD8 de pacientes con y sin infección o enfermedad por CMV postrasplante. B) Respuesta en células T CD4. C) Comparación de la respuesta T CD8 y CD4 frente al antígeno IE-1 en pacientes con infección o enfermedad por CMV. D) Comparación de la respuesta CD8 y CD4 de pacientes que no desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante. El test U Mann-Whitney se ha usado para analizar los datos de A y B, y el test de Wilcoxon se aplicó en C y D (figura tomada del artículo publicado en la revista Transplantation. Ver anexo 2).

La respuesta celular T CD4 frente al antígeno viral IE-1 en muestras pre-trasplante no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de pacientes (figura 19B). En los pacientes con ausencia de respuesta inmune pre-trasplante y reactivación viral no hubo diferencias significativas en las respuestas CD8 o

CD4 (figura 19C). En cambio, en los pacientes con respuesta positiva frente al antígeno IE-1 y libres de infección viral postrasplante presentaban una respuesta inmune en la que predominaba el compartimento CD8 sobre el CD4 (figura 19D).

Cuando se analizó la respuesta celular frente al antígeno viral pp65, en muestras pre-trasplante, de los pacientes con terapia anticipada, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la relación entre dicha respuesta y la presencia o ausencia de replicación viral postrasplante. Tampoco se observó predominancia de ninguna de las respuestas T CD8 o CD4 frente al antígeno pp65 (Figura 20).

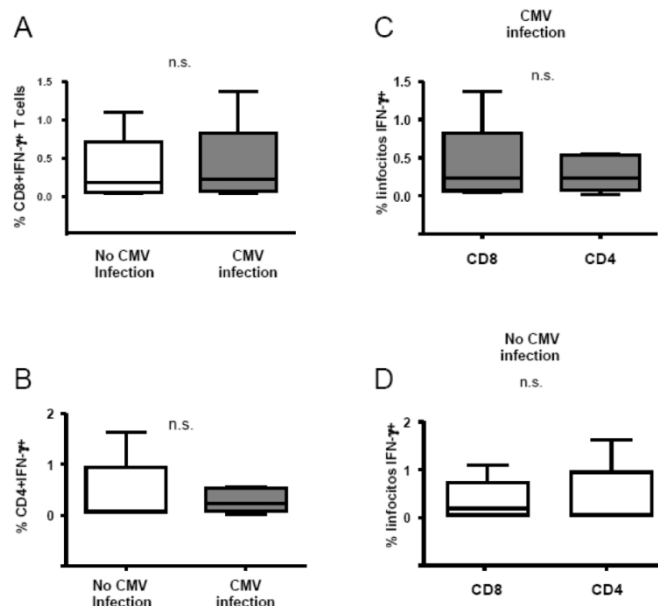


Figura 20: Respuesta celular T frente al antígeno viral pp65 en muestras pre-trasplante. A) Respuesta (mediana, percentiles 75 y 25 y SEM) en células T CD8 de pacientes con (N=7) y sin infección o enfermedad por CMV postrasplante (N=8). B) Respuesta en células T CD4. C) Comparación de la respuesta T CD8 y CD4 frente al antígeno pp65 en pacientes con infección o enfermedad por CMV (N=7). D) Comparación de la respuesta CD8 y CD4 de pacientes que no desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante (N=8). El test U Mann-Whitney se ha usado para analizar los datos de A y B, y el test de Wilcoxon se aplicó en C y D (figura tomada del artículo publicado en la revista Transplantation. Ver anexo 2).

La replicación viral postrasplante ocurrió en todos los casos durante los primeros 4 meses. Realizamos un análisis longitudinal de la respuesta específica celular T CD8 y CD4 frente a los antígenos virales IE-1 y pp65 durante el primer año postrasplante y observamos que sólo la respuesta CD8 frente al antígeno IE-1 fue diferente entre los grupos en los primeros 6 meses postrasplante (Figura 21).

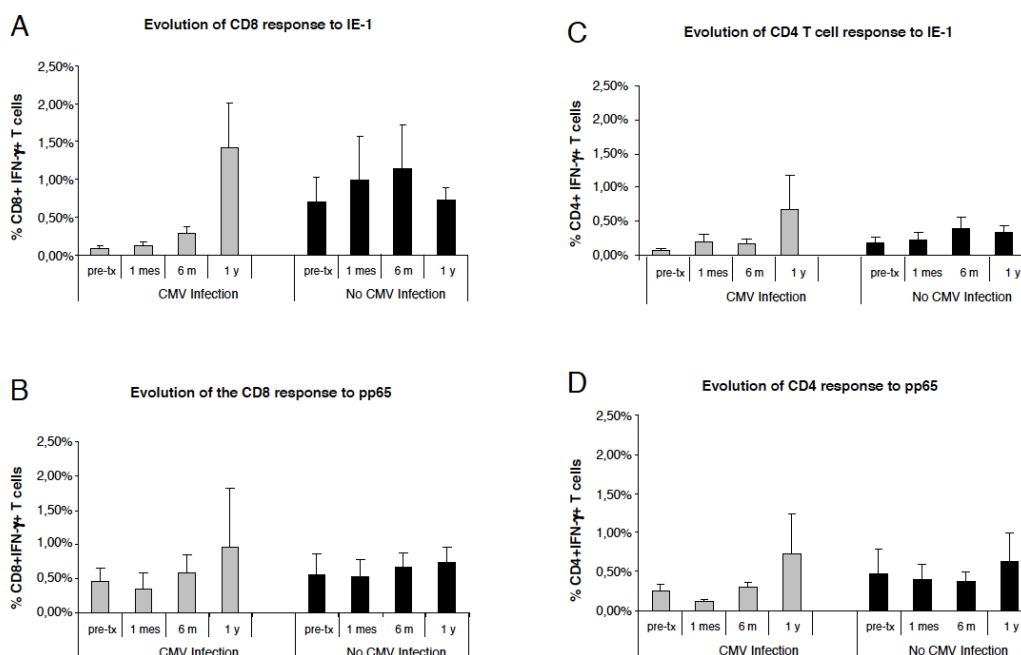


Figura 21: Evolución de la respuesta celular T frente a IE-1 y pp65 en pacientes trasplantados de riñón seropositivos para CMV que recibieron terapia anticipada como estrategia de prevención. Se analizó mediante citometría de flujo en linfocitos T CD3 seleccionados la frecuencia de células T CD8+ y CD4+ productoras de IFN-γ en muestras de sangre a lo largo del primer año (figura tomada del artículo publicado en la revista Transplantation. Ver anexo 2).

Estos datos sugieren que la respuesta celular T CD8 frente al antígeno IE-1 es el parámetro relevante que nos sirve para discriminar aquellos pacientes seropositivos en riesgo de desarrollar infección o enfermedad por CMV postrasplante. Esta hipótesis se confirmó tras el análisis de los datos mediante curvas ROC (figura 19). En este análisis los pacientes que presentaban en la muestra pre-trasplante una respuesta CD8 frente al

IE-1 baja (AUC=0.929;  $p=0.010$ ; 95%CI: 0.078-1.0) presentaban un riesgo significativo para desarrollar infección por CMV postrasplante.

El análisis ROC también se usó para identificar los puntos de corte de la respuesta celular T CD8 frente al antígeno IE-1, por debajo de los cuales existía un incremento del riesgo de presentar infección o enfermedad por CMV postrasplante (Figura 22).

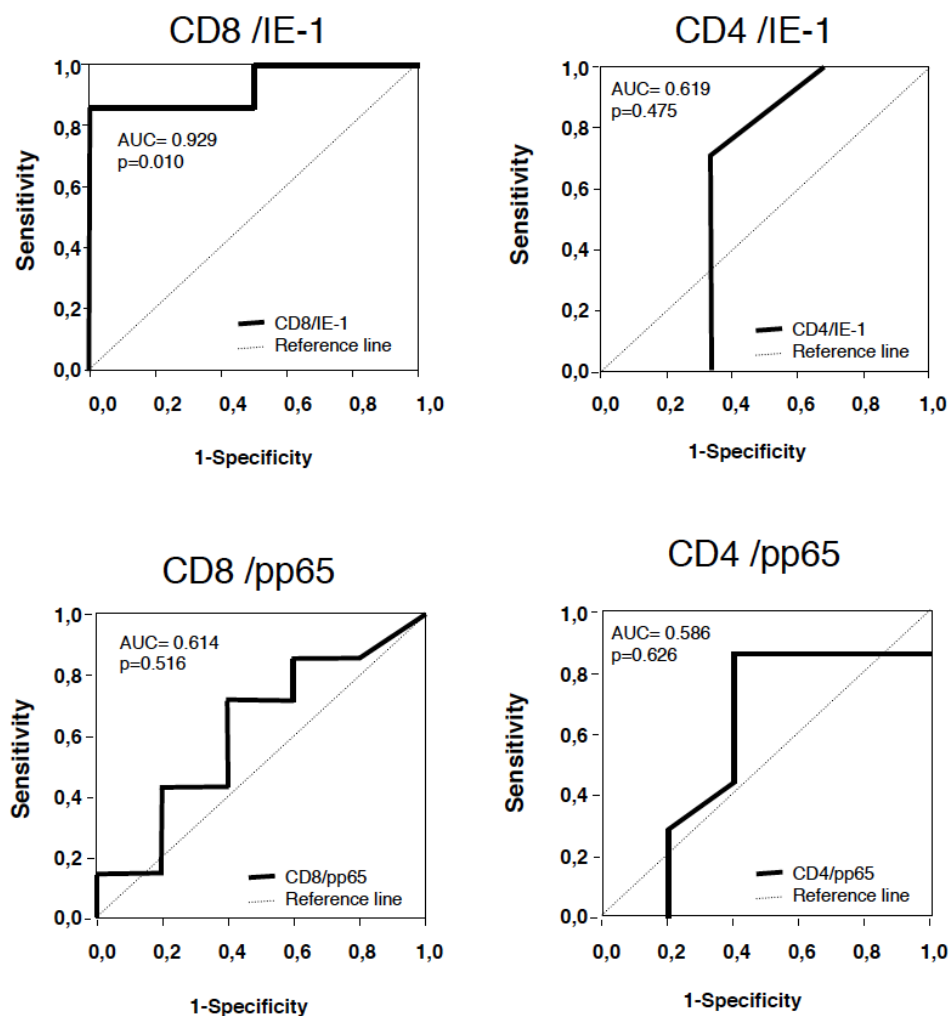


Figura 22: Análisis con curvas ROC de las células T específicas frente a IE-1 y pp65 en muestras pre-trasplante de pacientes con o sin infección por CMV postrasplante (AUC área bajo la curva; CI: intervalo de confianza) (figura tomada del artículo publicado en la revista Transplantation. Ver anexo 2).

Se calculó el índice de Youden's y el máximo obtenido se correspondió con un punto de corte de 0,055% de células T CD8+IFN- $\gamma$ + en respuesta a IE-1, con un 100%

de especificidad y un 85,7% de sensibilidad (todos los pacientes que tuvieron una respuesta celular T CD8  $\leq 0,05\%$  desarrollaron infección por CMV postrasplante). Valores por debajo de 0,22% tenían una especificidad del 85,7% y sensibilidad del 50%.

## B) Inmunidad innata: Expresión de receptores de la familia NKG2 en células NK y células T

### Expresión de CD94/NKG2C:

El receptor CD94/NKG2C es un receptor activador que se expresa en células NK y células T y cuyo ligando es la molécula de HLA no clásica HLA-E. Como receptor activador estimula a la célula para eliminar células infectadas por virus.

Analizamos la expresión del receptor activador CD94/NKG2C en células T y NK en estos 15 pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales (anti-IL2R, basiliximab) (Figura 23).

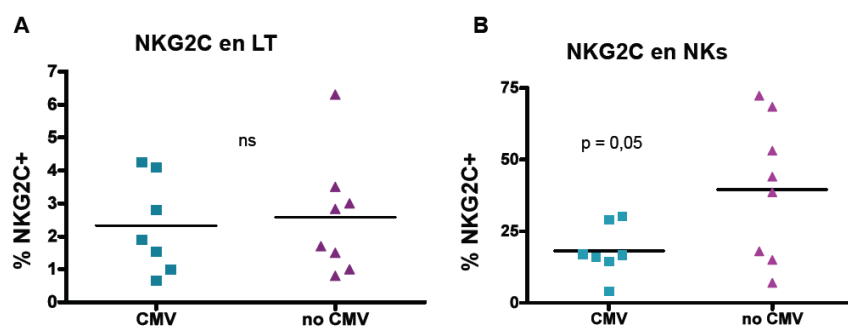


Figura 23: Porcentaje de linfocitos T (A) y NKs (B) que expresan el receptor activador CD94/NKG2C en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos, que recibieron tratamiento de inducción con basiliximab, en función de la presencia o ausencia de replicación viral post-trasplante. La expresión del receptor activador NKG2C en células NK en muestras pre-trasplante fue inferior en los pacientes que desarrollaron infección por CMV postrasplante. La expresión de dicho receptor en linfocitos T fue similar en los pacientes con y sin infección por CMV postrasplante.

Encontramos que los pacientes que desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante presentaban, en la muestra pre-trasplante, una frecuencia de células NK con expresión del receptor activador CD94/NKG2C menor que la de los pacientes que no presentaron replicación viral en el primer año postrasplante en el límite de la significación estadística ( $p = 0,05$ ) (Figura 23A). En linfocitos T la expresión de dicho receptor en la muestra pre-trasplante no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Figura 23B).

Cuando se analizó la evolución de la expresión del receptor NKG2C en células NK a lo largo del primer año observamos que en los pacientes con replicación viral postrasplante se producía un incremento de la frecuencia de las células NK que expresaban dicho receptor, aunque no fue estadísticamente significativo, mientras que en los pacientes que no presentaron replicación viral el porcentaje de células NK no mostró variaciones a lo largo del tiempo (Figura 24).

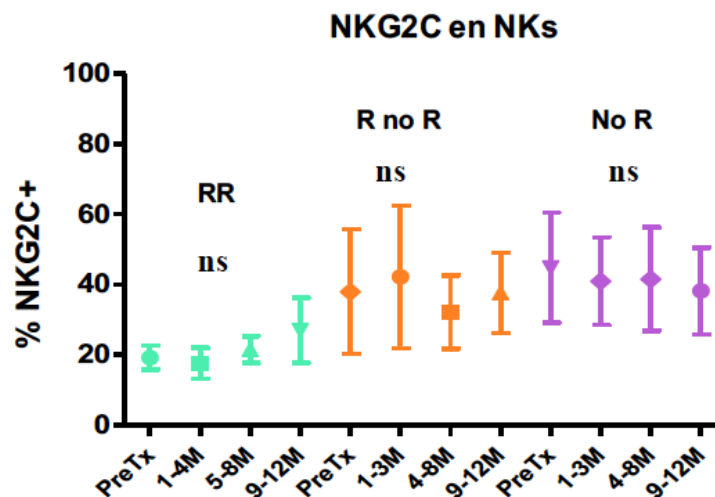


Figura 24: Evolución a lo largo del primer año de la frecuencia de células NK que expresan el receptor activador CD94/NKG2C en pacientes seropositivos en función de la presencia o ausencia de replicación viral post-trasplante. RR: pacientes con replicación viral relevante postrasplante. R no R: pacientes con replicación viral no relevante. No R: Pacientes sin replicación viral postrasplante.

### Expresión de CD94/NKG2A:

El receptor CD94/NKG2A es un receptor inhibidor que se expresa también en células T y NK. Dicho receptor inhibidor impide que la célula destruya células infectadas por virus. Reconoce el mismo ligando que el receptor activador CD94/NKG2C, por lo que el resultado neto derivado del reconocimiento de dianas que expresen HLA-E dependerá del equilibrio entre la expresión de NKG2A y NKG2C.

El análisis de la expresión del receptor CD94/NKG2A en células T y NK demostró que los pacientes que desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante presentaban, en la muestra pre-trasplante, una frecuencia de células T con expresión del receptor inhibidor CD94/NKG2A estadísticamente superior que la de los pacientes que no presentaron replicación viral postrasplante (Figura 25A). En las células NK la expresión de dicho receptor en la muestra pre-trasplante también era mayor en los pacientes con replicación viral postrasplante aunque no fue estadísticamente significativo (figura 25B).

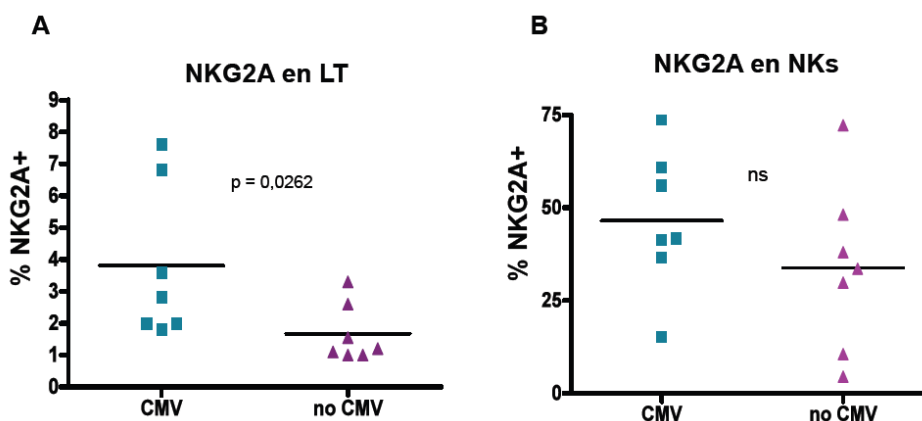


Figura 25: Porcentaje de linfocitos T (A) y NKs (B) que expresan el receptor inhibidor CD94/NKG2A en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos, que recibieron tratamiento de inducción con anti-IL-2R, en función de la presencia o ausencia de replicación viral post-trasplante. La expresión del receptor inhibidor CD94/NKG2A en células T en muestras pre-trasplante fue superior en los pacientes que desarrollaron infección por CMV postrasplante ( $p = 0,0262$ ). La expresión del receptor CD94/NKG2A en células NK fue similar en los pacientes con y sin infección por CMV postrasplante.

Aunque el tamaño muestral es pequeño, estos resultados sugieren que en pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción para el trasplante renal con anticuerpos monoclonales (anti-IL-2R, basiliximab) la presencia antes del trasplante de un elevado porcentaje de células NK que expresan el receptor activador CD94/NKG2C podría proteger de la replicación viral postrasplante, mientras que un elevado porcentaje de linfocitos T que expresen el receptor inhibidor CD94/NKG2A podría favorecer la replicación viral.

### Expresión de NKG2D:

El receptor NKG2D es un receptor activador que se expresa en linfocitos T y células NK y cuyos ligandos son las moléculas MIC-A y MIC-B y la familia ULBP. Como receptor activador estimula a la célula para eliminar células infectadas por virus.

El análisis pre-trasplante de la expresión del receptor NKG2D en células T y NK no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaron infección o enfermedad por CMV y los que no la presentaron (Figura 26).

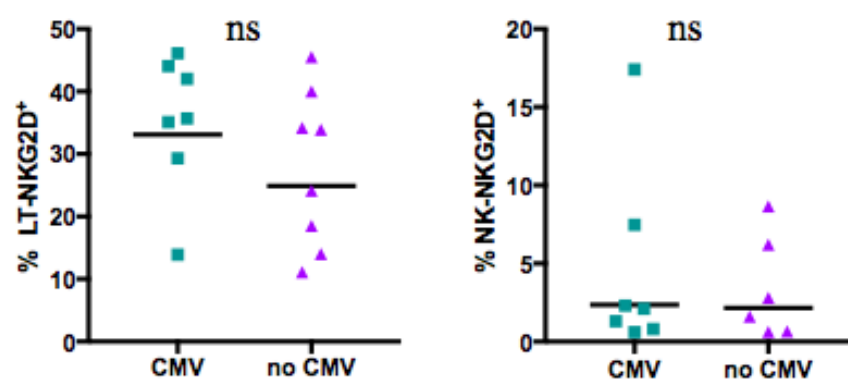


Figura 26: Media de expresión del receptor NKG2D en linfocitos T (A) y NKs (B) en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos, que recibieron tratamiento de inducción con basiliximab, en función de la presencia o ausencia de replicación viral post-trasplante. No diferencias en la expresión del receptor NKG2D en células NK y T.



### Pacientes con profilaxis universal

Analizamos cuarenta y seis pacientes con riesgo alto de replicación viral postrasplante y que recibieron profilaxis universal (véase figura 10 del apartado H.2., página 77); nueve pacientes eran seronegativos para CMV y treinta y siete seropositivos a los que se les había tratado con anticuerpos policlonales como inducción del trasplante. Se presentan los resultados por separado según la serología CMV del receptor.

### Fase clínica

#### Infección / enfermedad por CMV

En los pacientes seropositivos la incidencia acumulada, en el primer año postrasplante, de infección por CMV fue del 29,7% (N=11) y de enfermedad por CMV del 2,7% (N=1, síndrome viral). La replicación viral se presentó de media a los  $3,7 \pm 2$  meses después del trasplante (rango 0,5 - 7 meses). Seis pacientes fueron tratados con valganciclovir oral y reducción de la dosis de ácido micofenólico, cuatro con valganciclovir oral y dos con disminución del ácido micofenólico. No se detectaron casos de resistencia al tratamiento con valganciclovir.

En los pacientes seronegativos la incidencia acumulada de infección por CMV fue del 33,3% (N=3) y de enfermedad por CMV del 22,2% (N=2, síndrome viral). La replicación viral se presentó de media a los  $7,5 \pm 2,4$  meses después del trasplante. Los cinco pacientes fueron tratados con valganciclovir oral y reducción de la dosis de ácido micofenólico. No se detectaron casos de resistencia al valganciclovir.

Los veintinueve pacientes restantes no presentaron replicación viral postrasplante; 25 pacientes eran seropositivos y 4 seronegativos. De los pacientes seropositivos 9 no presentaron replicación viral en ningún momento postrasplante

mientras que 16 pacientes mostraron una determinación positiva de antigenemia pp65 que no se confirmó en los tests siguientes. De los 4 pacientes seronegativos, 3 de ellos no presentaron replicación viral y 1 mostró una antigenemia pp65 positiva no confirmada posteriormente. Estos pacientes fueron clasificados como replicación viral clínicamente irrelevante y se les consideró como libres de infección por CMV en el análisis clínico de los datos.

### Eventos clínicos postrasplante

La replicación viral postrasplante no se asoció de forma estadísticamente significativa con más episodios de rechazo agudo en el primer año, diabetes mellitus postrasplante, infecciones que requieran ingreso, complicaciones quirúrgicas o retraso en la función inicial del injerto ni en los pacientes seropositivos (tabla 16) ni en los seronegativos (tabla 17).

Tabla 16: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes **seropositivos** que recibieron profilaxis universal como estrategia de prevención frente al CMV según la presencia de replicación viral CMV postrasplante.

(R+)	CMV si (N=12)	CMV no (N=25)	p
Rechazo agudo por biopsia– N (%)	1 (8,3)	5 (20%)	ns
Infecciones con ingreso – N (%)	4 (33,3)	13 (52)	ns
Diabetes mellitus de novo – N (%)	0	1 (4)	ns
Complicaciones quirúrgicas – N (%)	0	4 (16)	ns
Retraso función inicial injerto – N (%)	3 (25)	2 (8)	ns

Tabla 17: Eventos clínicos en el primer año postrasplante en pacientes **seronegativos** que recibieron profilaxis universal como estrategia de prevención frente al CMV según la presencia de replicación viral.

(R-)	CMV si (N=5)	CMV no (N=4)	p
Rechazo agudo por biopsia– N (%)	1 (20)	0	ns
Infecciones con ingreso – N (%)	4 (80)	3 (75)	ns
Diabetes mellitus de novo – N (%)	1 (20)	0	ns
Complicaciones quirúrgicas – N (%)	1 (20)	1 (25)	ns
Retraso función inicial injerto – N (%)	1 (20)	0	ns

La función renal y la supervivencia del paciente y del injerto a los 5 años no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con o sin infección o enfermedad por CMV postrasplante ya fuesen seropositivos o seronegativos (tabla 18).

Tabla 18: Función renal y supervivencia del paciente y del injerto en pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron profilaxis universal según la replicación viral CMV postrasplante

	R + (N=37)		R - (N=9)		p (R + / R-)
	CMV Si (N=12)	CMV no (N=25)	CMV si (N=5)	CMV no (N=4)	
Creatinina (mg/dl) (x±ds)					
5 años	1,6 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,7 ± 0,12	1,4 ± 0,2	ns
Proteinuria (gr./24 h) (x±ds)					
5 años	0,4 ± 0,8	0,2 ± 0,1	0,14 ± 0,12	0,1 ± 0,03	ns
Supervivencia injerto (%)					
5 años	11 (91,7)	22 (88)	4 (80)	4 (100)	ns
Supervivencia paciente (%)					
5 años	11 (91,7)	23 (92)	5 (100)	4 (100)	ns

## Fase Experimental: Monitorización inmunológica

### A) Expresión de IFN- $\gamma$ en las poblaciones linfocitarias T en respuesta a antígenos virales.

Se analizó la respuesta inmune a los antígenos virales pp65 e IE-1 en 7 pacientes seronegativos para CMV y en 36 seropositivos que recibieron profilaxis universal como estrategia de prevención, en muestras de sangre pretrasplante, al mes, 6 y 12 meses postrasplante. En primer lugar, observamos que la respuesta inmune celular CD8 y CD4 frente a los antígenos virales en la muestra pretrasplante fue diferente en los pacientes seronegativos y seropositivos analizados, como era de esperar, siendo significativamente inferior en los pacientes seronegativos (Figura 27). Este hecho refleja la ausencia de contacto previo con el virus y confirma el resultado negativo determinado mediante la serología.

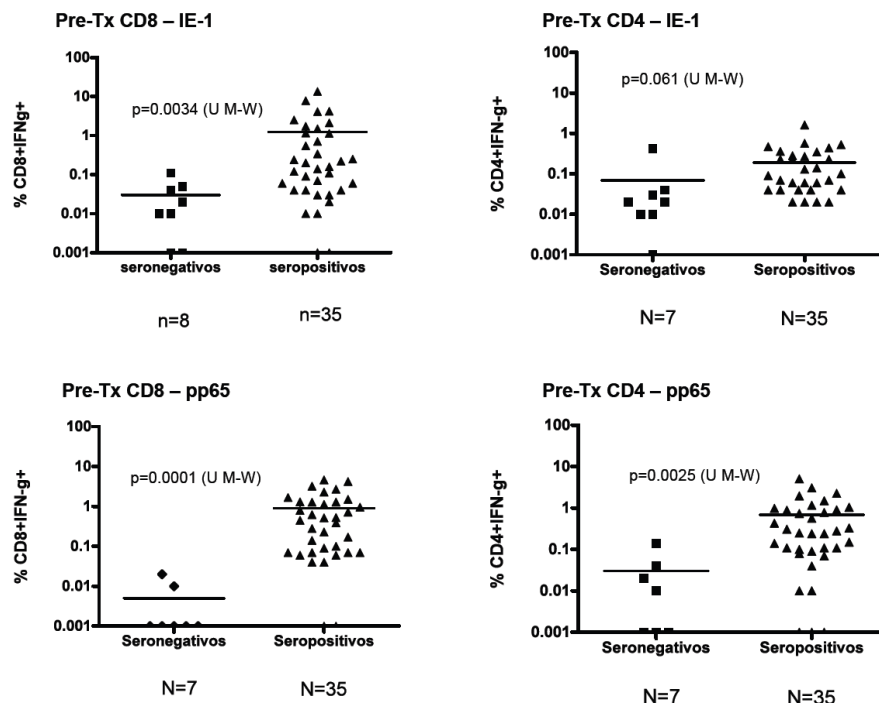


Figura 27: Análisis de la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos pp65 e IE-1 en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos y seronegativos. La respuesta inmune celular T CD8 y CD4 a los antígenos virales es significativamente inferior en los pacientes seronegativos comparado con los seropositivos.

Cuando comparamos la respuesta CD8 o CD4 a ambos péptidos en las muestras pretrasplante de los pacientes seropositivos observamos que la respuesta CD8 a ambos antígenos fue similar, mientras que la respuesta CD4 a pp65 fue significativamente superior que la respuesta a IE-1, lo que demuestra una mayor conservación de la memoria CD4 frente a pp65 que la de IE-1 (Figura 28) en este grupo de pacientes.

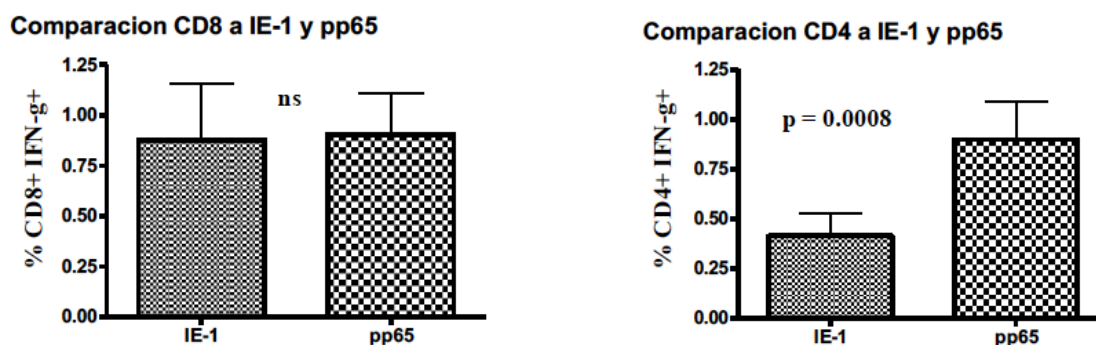


Figura 28: Comparación de la respuesta T CD8 y CD4 pre-trasplante frente a los antígenos virales IE-1 y pp65 en pacientes seropositivos. Antes del trasplante, los pacientes seropositivos presentan una respuesta T CD8 similar a ambos antígenos virales mientras que la respuesta T CD4 a pp65 es significativamente superior que la respuesta T CD4 a IE-1.

Posteriormente comparamos la respuesta inmune CD8 y CD4 a ambos antígenos virales en ambos grupos de pacientes en función de la presencia o ausencia de replicación viral (figura 29).

Encontramos que, en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos, la respuesta celular T CD8 al antígeno viral IE-1 fue significativamente superior en los pacientes que no presentaron en ningún momento replicación viral postrasplante (grupo no R) comparado con la respuesta inmune T CD8 de los pacientes que sí desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante tras la suspensión de la profilaxis universal (grupo RR) y la de los pacientes que presentaron replicación viral en algún momento postrasplante tras la retirada de la profilaxis universal, pero que no supuso ningún cambio de inmunosupresión o inicio de antiviral (grupo R no R) (Figura 29A).

La respuesta T CD4 al antígeno viral IE-1 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes (Figura 29B).

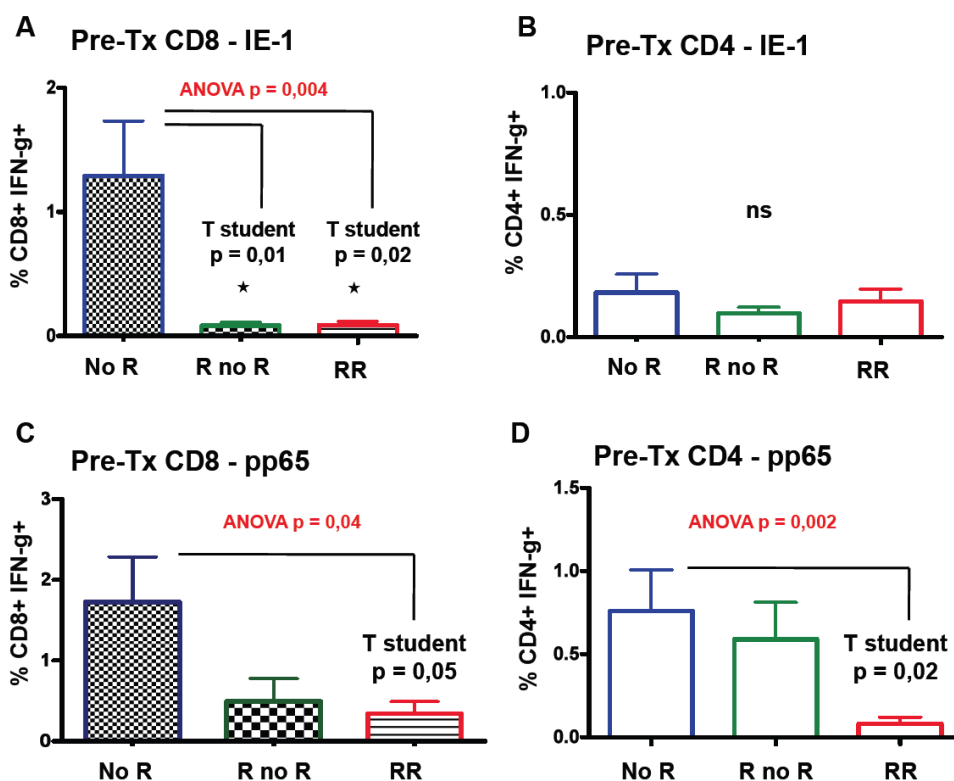


Figura 29: Comparación de la respuesta celular T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 en muestras pre-trasplante de pacientes seropositivos que presentaron replicación viral relevante postrasplante (RR), replicación viral no relevante (R no R) y de aquellos con ausencia de replicación viral (no R). Aislamos células mononucleares de sangre periférica de pacientes que recibieron un injerto renal y fueron estimuladas y cultivadas in vitro con los antígenos virales IE-1 y pp65. Mediante citometría de flujo detectamos la frecuencia de células T CD8 y CD4 productoras de IFN- $\gamma$  en linfocitos CD3 seleccionados. A) Comparación de la respuesta T CD8 al antígeno IE-1 en los tres grupos de pacientes. B) Comparación de la respuesta T CD4 al antígeno IE-1. C) Comparación de la respuesta T CD8 al antígeno pp65. D) Comparación de la respuesta T CD4 al antígeno pp65.

Cuando analizamos la respuesta pretrasplante T CD8 y CD4 al antígeno viral pp65 encontramos que, los pacientes que no desarrollaron replicación viral postrasplante (grupo no R) presentaban una respuesta T CD8 y CD4 significativamente superior que la de los pacientes que presentaron infección o enfermedad por CMV

postrasplante tras la finalización de la profilaxis universal (grupo RR) (Figura 29C y 29D).

En los pacientes seronegativos la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 en muestras pre-trasplante no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de pacientes (Figura 30).

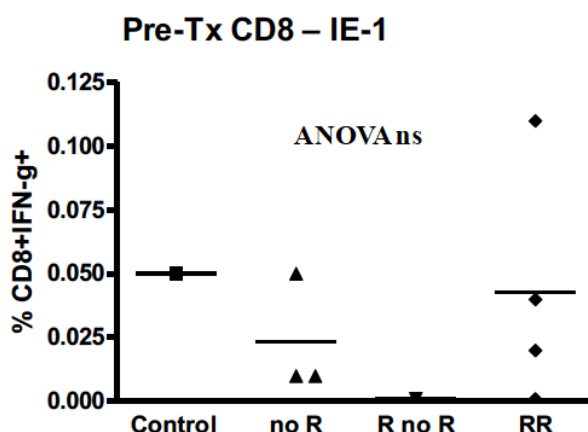


Figura 30: Comparación de la respuesta T CD8 al antígeno viral IE-1 en muestras pretrasplante de pacientes seronegativos en función de la presencia o ausencia de replicación viral (No R: No replican, R no R: replicación no relevante, RR: replicación relevante). La respuesta T CD8 a IE-1 antes del trasplante no muestra diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes.

En el análisis longitudinal de la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 durante los dos primeros años postrasplante observamos que sólo la respuesta T CD8 a IE-1 cambiaba significativamente a lo largo de los dos años postrasplante en los pacientes que presentaron infección o enfermedad por CMV postrasplante (grupo RR, Figura 31), mientras que la respuesta T CD8 a pp65 también aumentaba aunque no de forma significativa. La respuesta T CD4 a ambos antígenos virales se mantenía estable a lo largo de los dos años.

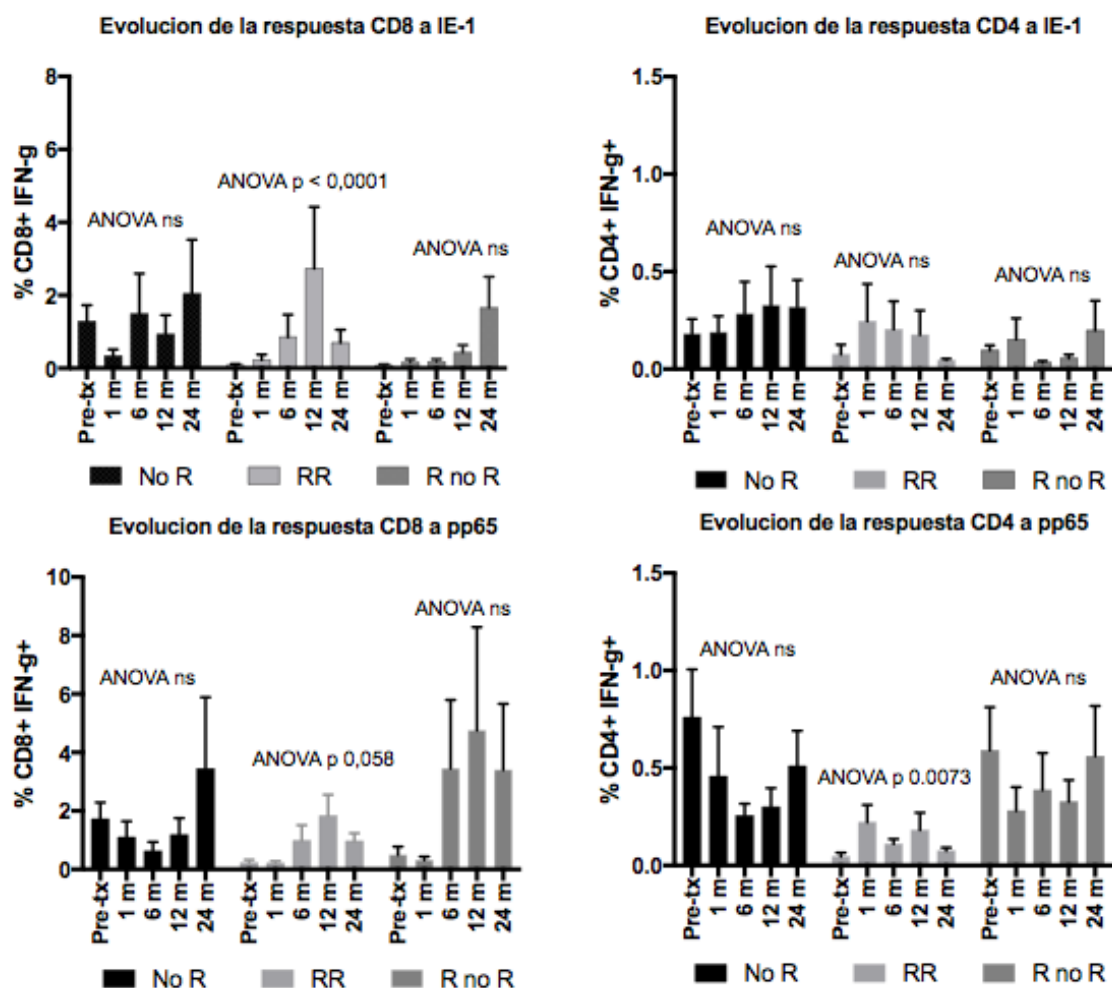


Figura 31: Análisis longitudinal de la respuesta T CD8 y CD4 a los antígenos virales pp65 e IE-1 durante los dos primeros años postrasplante de pacientes seropositivos en función de la presencia o ausencia de replicación viral (No R: No replican, R no R: replicación no relevante, RR: replicación relevante). En los pacientes con replicación relevante la respuesta T CD8 a IE-1 aumenta significativamente a lo largo del primer año. La respuesta T CD8 a pp65 también aumenta en este grupo de pacientes aunque no de manera significativa. En el grupo no R y R no R la respuesta T CD8 y CD4 a pp65 e IE-1 no cambia a lo largo del primer año de forma significativa.

Estos datos sugieren que los pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios (timoglobulina) la respuesta T CD8 al antígeno viral IE-1 y las respuestas T CD8 y T CD4 al antígeno viral pp65 en el momento pretrasplante son capaces de definir aquellos pacientes en riesgo de desarrollar infección o enfermedad por CMV tras la suspensión del tratamiento profiláctico con valganciclovir.





La expresión del receptor activador CD94/NKG2C en células T y NK, en muestras pre-trasplante, de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes en función de la presencia o ausencia de infección o enfermedad por CMV postrasplante (Figura 33).

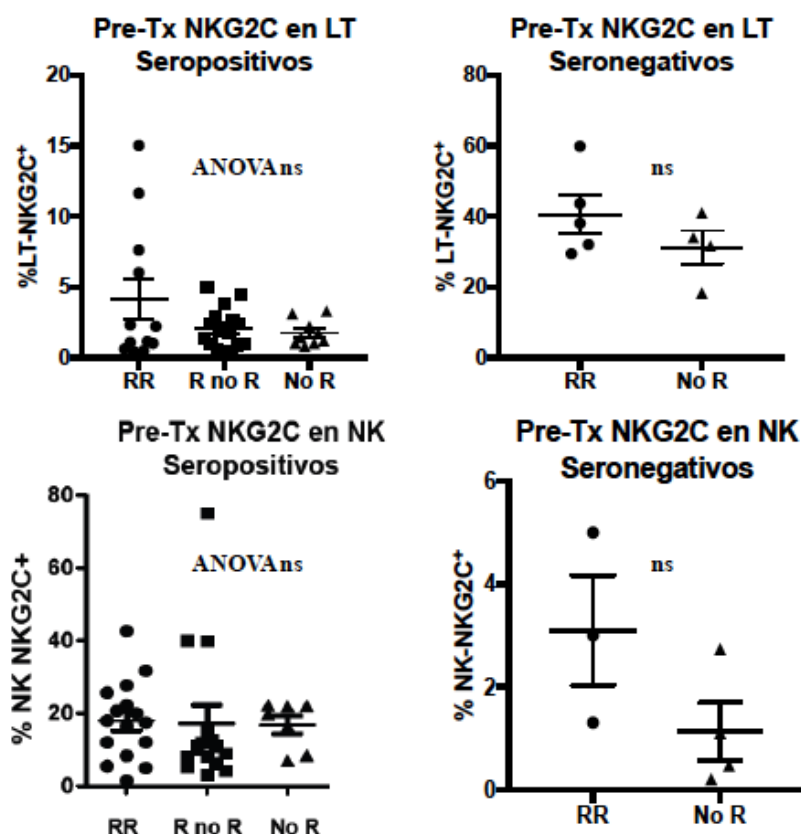


Figura 33: Análisis, en muestras pre-trasplante, de la expresión del receptor CD94/NKG2C en células T y NK de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión del receptor CD94/NKG2C entre los pacientes seropositivos o seronegativos con o sin replicación viral.

Posteriormente analizamos la evolución de la frecuencia de dichas células que expresan el receptor CD94/NKG2C a lo largo del primer año, tanto en pacientes seropositivos como en seronegativos y observamos un comportamiento diferente entre ambos grupos de pacientes (Figura 34).

Los pacientes seronegativos que presentaron replicación viral postrasplante presentaban un aumento del porcentaje de células T NKG2C+ en el momento de la replicación viral y se mantenía elevado hasta 1 año después del trasplante. En cambio el porcentaje de células NK con expresión del receptor NKG2C en los pacientes seronegativos, aumentaba al año del trasplante permaneciendo sin cambios en el momento de la replicación viral (Figura 34A). Estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

Los pacientes seropositivos no presentaron cambios significativos de la frecuencia de células T o NK con expresión del receptor CD94/NKG2C durante la replicación viral ni en momentos posteriores (Figura 34B).

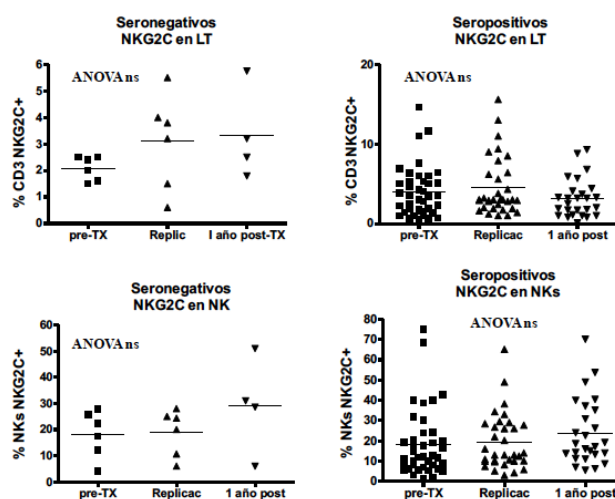


Figura 34: Evolución de la expresión del receptor activador CD94/NKG2C en linfocitos T y células NK de pacientes seronegativos (A) y seropositivos (B) para CMV, en muestras pre-trasplante, en el momento de la replicación viral y un año post-trasplante. Los pacientes seronegativos presentan un incremento de la expresión del receptor CD94/NKG2C en el momento de la replicación viral en linfocitos T y al año del trasplante en células NK. Los pacientes seropositivos que replican no presentan cambios a lo largo del primer año postrasplante en la expresión de dicho receptor.

En pacientes que no presentaron replicación viral postrasplante no se produjo cambios en el porcentaje de células NK que expresaban el receptor activador CD94/NKG2C a lo largo del primer año.

### Expresión del receptor CD94/NKG2A:

El receptor CD94/NKG2A es un receptor inhibidor que se expresa también en células T y NK. Dicho receptor inhibidor impide que la célula destruya células infectadas por virus. Reconoce el mismo ligando que el receptor CD94/NKG2C. El resultado neto derivado del reconocimiento de dianas que expresen HLA-E dependerá del equilibrio entre la expresión de NKG2A y NKG2C.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de dicho receptor en linfocitos T o células NK, entre los pacientes seropositivos o seronegativos en la muestra pre-trasplante (Figura 35).

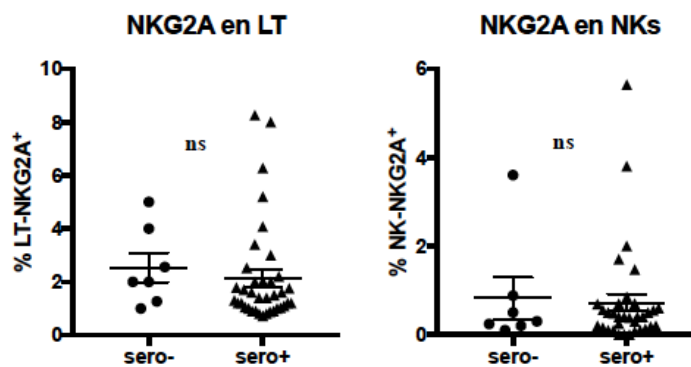


Figura 35: Porcentaje de células T (A) y NK (B) que expresan el receptor CD94/NKG2A en muestras pre-trasplante, en función del estatus serológico para CMV. La expresión del receptor CD94/NKG2A en linfocitos T y células NKs es similar en pacientes seropositivos y seronegativos.

La expresión del receptor activador CD94/NKG2A en células T y NK, en muestras pre-trasplante, de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes en función de la presencia o ausencia de infección o enfermedad por CMV postrasplante (Figura 36).

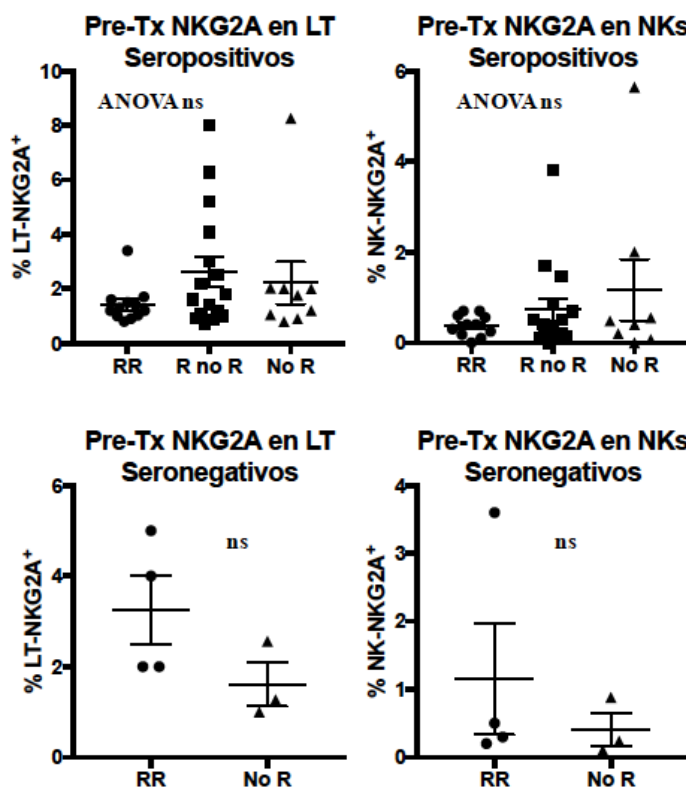


Figura 36: Análisis, en muestras pre-trasplante, de la expresión del receptor CD94/NKG2A en células T y NK de pacientes seropositivos y seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de dicho receptor entre los pacientes seropositivos o seronegativos con o sin replicación viral.

El análisis evolutivo, durante los dos primeros años postrasplante, de la expresión de NKG2A en células NK de pacientes que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos-antilinfocitarios, no revela diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos, sin embargo se observa una menor expresión de dicho receptor en las células NK en los pacientes que presentaron replicación viral comparado con la expresión en los pacientes en los que la replicación fue no relevante o no presentaron replicación viral (Figura 37).

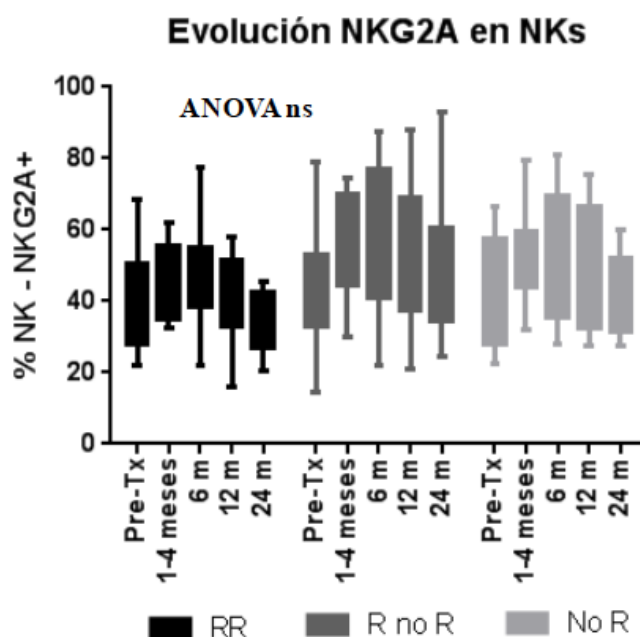


Figura 37: Evolución durante los dos primeros años de la expresión del receptor CD94/NKG2A en células NKs de pacientes seropositivos que han recibido tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios. La expresión del receptor CD94/NKG2A en células NKs de pacientes seropositivos con infección o enfermedad por CMV (grupo RR) es inferior a lo largo de los dos primeros años postrasplante comparado con los pacientes que no tuvieron infección por CMV (grupo R no R y No R).

### Expresión de NKG2D:

El receptor NKG2D es un receptor activador que se expresa en linfocitos T y células NK y cuyos ligandos son las moléculas MIC-A y MIC-B y la familia ULBP. Como receptor activador estimula a la célula para eliminar células infectadas por virus.

La expresión de dicho receptor en células NK y T en muestras pre-trasplante, fue superior en pacientes seropositivos comparado con los pacientes seronegativos (Figura 38), siendo la expresión en linfocitos T estadísticamente significativa entre los dos grupos de pacientes.

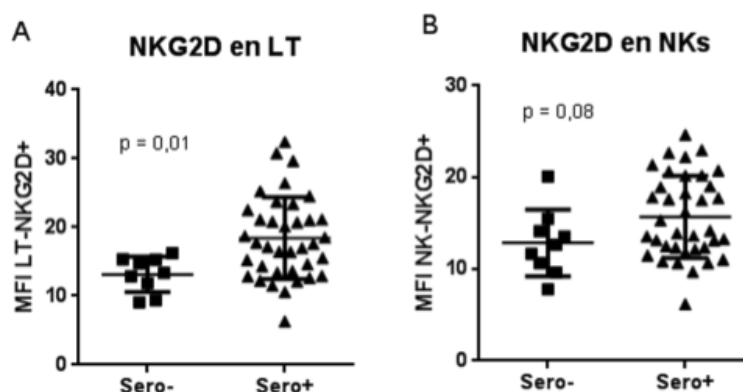


Figura 38: Intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T (A) y células NK (B) en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos y seronegativos. Los pacientes seropositivos presentan una mayor expresión significativa del receptor NKG2D tanto en linfocitos T como en células NK.

El análisis de expresión de dicho receptor en linfocitos T y células NK, en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos, demostró que los pacientes que desarrollaron infección o enfermedad por CMV postrasplante presentaban una menor intensidad de expresión del receptor, aunque no fue estadísticamente significativa, comparado con la expresión en los pacientes que no presentaron replicación viral postrasplante (figura 39).

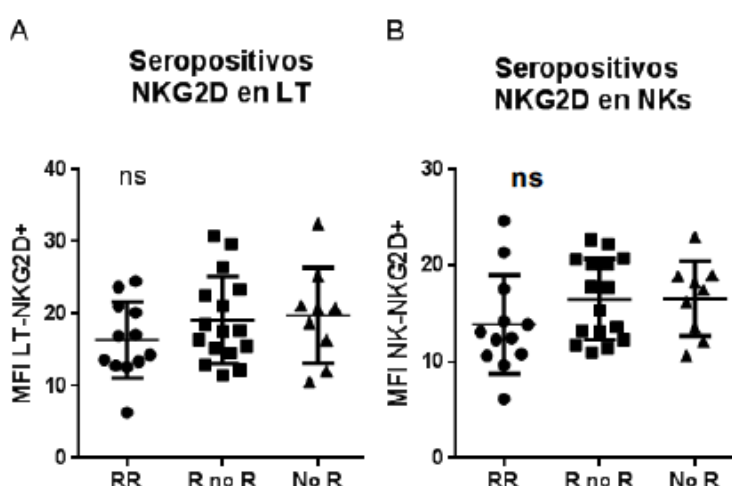


Figura 39: Intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T (A) y células NK (B) en muestras pretrasplante de pacientes seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, en función de la presencia de replicación viral postrasplante. La expresión del receptor NKG2D en linfocitos T y células NK, antes del trasplante, es inferior en los pacientes que desarrollaron

infección o enfermedad por CMV postrasplante (grupo RR) comparado con la expresión en pacientes sin infección o enfermedad por CMV (grupos R no R y No R), aunque no fue estadísticamente significativo.

Estos resultados sugieren que una mayor expresión pre-trasplante del receptor activador NKG2D en células T y NK de pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios podría protegerles del desarrollo de infección o enfermedad por CMV postrasplante.

En los pacientes seronegativos encontramos que durante la replicación hay una tendencia al aumento de la expresión de NKG2D tanto en linfocitos T como en NK que se mantiene en el tiempo (figura 40 A y C) que no encontramos en los pacientes seropositivos (figura 40 B y D).

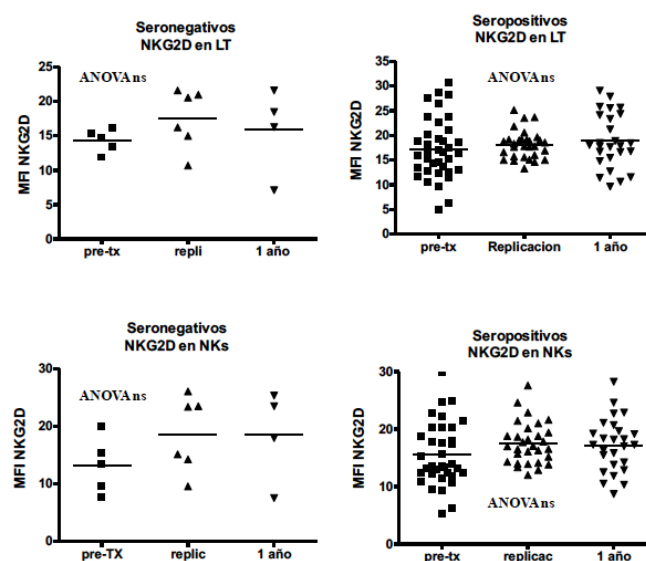


Figura 40: Evolución de la intensidad de expresión de NKG2D en linfocitos T y células NK de pacientes con trasplante renal. Los pacientes seronegativos presentan un incremento no significativo de la expresión del receptor NKG2D en el momento de la replicación viral tanto en linfocitos T como en células NK. Los pacientes seropositivos que replican no presentan cambios a lo largo del primer año postrasplante en la expresión de dicho receptor.



## DISCUSIÓN



La infección/enfermedad por CMV continúa siendo una complicación frecuente en los pacientes que reciben un trasplante renal, a pesar de los avances que se han realizado en los últimos años en el manejo de esta complicación.

El primer hito en el control de la replicación viral del CMV postrasplante fue la aparición de fármacos antivirales potentes y el uso de estrategias de prevención, a las que se sumó la mejora en los métodos diagnósticos. A día de hoy son las piedras angulares de la prevención del CMV, ya que han mejorado de forma importante el cuidado de los pacientes y los resultados del trasplante a largo plazo. En este escenario, las estrategias de prevención han conseguido disminuir el riesgo de infección y enfermedad por CMV<sup>6,14</sup>, el de rechazo agudo y la mortalidad y la pérdida del injerto a largo plazo<sup>6,7,12,15-17</sup>. Sin embargo no son suficientes para evitar la reactivación del virus en pacientes seropositivos o la infección primaria en pacientes seronegativos.

Durante las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto que la monitorización inmunológica, tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa frente al CMV desempeñan un papel crucial en el control del CMV y su monitorización antes y después del trasplante está demostrando ser un avance importante en la capacidad de predecir qué pacientes tienen más riesgo de desarrollar infección/enfermedad por CMV postrasplante<sup>34-36,69-72</sup>. En este contexto, se ha debatido ampliamente el papel de la inmunidad celular específica frente al CMV como herramienta útil que podría ayudar a controlar dicha complicación. El análisis de las sub-poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 específicos frente al CMV reflejan la capacidad del paciente para controlar el virus, pueden predecir pacientes en riesgo de desarrollar infección o enfermedad postrasplante y ayudarían a los clínicos a definir mejor la estrategia de prevención específica para el paciente<sup>133</sup>. Sin embargo, la monitorización aislada de la respuesta de células T específicas frente al CMV no explica

todos los casos de reactivación viral postrasplante ya que existe hasta un 10% de pacientes con inmunidad celular específica desarrollada que presentan infección o enfermedad por CMV tardía<sup>152</sup>. Este hecho podría sugerir la necesidad de incluir otros enfoques en la monitorización de los pacientes, como es el estudio de marcadores de la inmunidad innata o el empleo de fármacos inmunosupresores con un perfil protector frente al CMV.

En nuestro estudio desarrollado en la cohorte retrospectiva de pacientes trasplantados de riñón, confirmamos que la replicación viral tras el trasplante disminuye la supervivencia del injerto y del paciente, comportándose como un factor de riesgo de pérdida del injerto pero no de mortalidad a largo plazo. Una monitorización clínica más estrecha a los pacientes con infección o enfermedad por CMV ayudaría a disminuir el daño provocado por el virus sobre el injerto y el paciente a largo plazo. Este estudio confirma también en población española que las estrategias de prevención frente al CMV disminuyen la incidencia de infección y enfermedad por CMV postrasplante.

En el estudio desarrollado en la cohorte prospectiva de pacientes trasplantados de riñón, sugerimos que en los pacientes seropositivos para CMV que van a recibir un trasplante renal con tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales (anti-IL2R, basiliximab) la ausencia pre-trasplante de inmunidad celular T CD8 frente al antígeno viral IE-1 (pero no frente a pp65) supone un mayor riesgo de replicación viral postrasplante. Así mismo, en este mismo grupo de pacientes sugerimos que la presencia antes del trasplante de un elevado porcentaje de células NK que expresan el receptor activador CD94/NKG2C podría proteger de la replicación viral postrasplante, mientras que un elevado porcentaje de linfocitos T que expresen el receptor inhibidor CD94/NKG2A podría favorecer la replicación viral.

Por otro lado en los pacientes seropositivos para CMV que van a recibir un injerto renal con tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, la ausencia pre-trasplante de una respuesta T CD8 frente al antígeno viral IE-1 y la ausencia de respuestas T CD8 y T CD4 frente al antígeno viral pp65 define aquellos pacientes en riesgo de desarrollar infección o enfermedad por CMV tras la suspensión del tratamiento profiláctico con valganciclovir. El análisis de la inmunidad innata en este grupo de pacientes no reveló diferencias estadísticamente significativas en la expresión pre-trasplante de los diferentes receptores NKG2 entre los pacientes con o sin replicación viral postrasplante.

A continuación, se discuten en detalle los resultados obtenidos en este trabajo:

### **1. - Infección y enfermedad por CMV después del trasplante renal y su impacto en la supervivencia del paciente y del injerto a largo plazo.**

La incidencia acumulada, en el primer año postrasplante, de infección por CMV fue del 34,7% y de enfermedad del 9,5%. Nuestros datos son concordantes con lo descrito previamente por otros grupos que utilizan estrategias de prevención<sup>6,14</sup> y reflejan un importante descenso de la incidencia de infección y enfermedad por CMV tras el uso de las mismas. Sin embargo existen diferencias entre las estrategias de prevención. A pesar del uso de profilaxis universal, la incidencia de enfermedad por CMV en pacientes de alto riesgo fue superior a la que presentaron los pacientes con terapia anticipada, aunque no fue estadísticamente significativo (PU 12,4% vs. TA 8,2%,  $p=0,19$ ), hecho ya conocido también por otros estudios realizados previamente<sup>21-23</sup> y favorecido por la ausencia de inmunidad celular específica frente al CMV en estos pacientes que los proteja adecuadamente frente a la reactivación viral. Por el contrario los pacientes con terapia anticipada presentaron tasas de infección por CMV superiores a los pacientes con profilaxis universal, hecho que es inherente a la propia estrategia y

que ha sido ampliamente demostrado en la literatura por numerosos autores y recogido en varios metanálisis<sup>23,24</sup>.

El cambio de ganciclovir por valganciclovir disminuyó la incidencia de enfermedad, lo que pone de manifiesto la eficacia del valganciclovir en la prevención de la enfermedad por CMV. Este comportamiento ya fue comunicado por Paya et al<sup>25</sup> y es atribuible al mayor grado de exposición a ganciclovir alcanzado con valganciclovir (aproximadamente 1,7 veces mayor). En nuestro estudio el efecto del fármaco empleado en cada periodo de tiempo no influyó de forma diferente en la supervivencia global del paciente ni en la del injerto tras realizar un análisis de Cox estratificado por periodo de tiempo.

El principal resultado de nuestro estudio es la asociación significativa entre la presencia de infección/enfermedad por CMV en los primeros meses después del trasplante y la pérdida del injerto a largo plazo, siendo la mediana de seguimiento de 8 años.

El análisis multivariante demostró que los pacientes con infección por CMV presentaron 1,7 veces más riesgo de perder el injerto que los pacientes sin infección por CMV y que los pacientes con enfermedad por CMV presentaron 2,6 veces más riesgo de perder el injerto que aquellos que no presentaron enfermedad por CMV. Otros autores también demostraron este efecto negativo de la replicación viral en la supervivencia del injerto<sup>17, 26-29</sup>.

Pero este mayor riesgo de pérdida del injerto es matizable en función de la estrategia de prevención empleada, de forma que el mayor riesgo de pérdida del injerto está asociado a la replicación viral postrasplante cuando habiendo recibido profilaxis universal, ésta no es efectiva y se produce la infección o enfermedad CMV. Esto

demuestra que el efecto deletéreo del CMV a largo plazo sobre el injerto alcanza su máxima expresión en los pacientes considerados como de alto riesgo.

Hay otros trabajos, incluyendo metanálisis que no encontraron asociación entre la replicación de CMV y la supervivencia del injerto<sup>18-20,24</sup>, posiblemente porque el tiempo de seguimiento de dichos estudios fue muy inferior al nuestro y cuando se trata de evaluar el éxito del trasplante la importancia del largo plazo es incuestionable.

El daño que produce el CMV en el injerto podría ser un importante factor de disfunción crónica y pérdida del mismo. Esto puede ser explicado por varias razones, por un lado, debido a la inflamación que los antígenos virales provocan en el injerto<sup>30</sup> y por otro lado, por su capacidad de provocar una respuesta inmunoestimuladora que favorecería la aparición de rechazo. Tanto el CMV como el rechazo son importantes factores de riesgo de pérdida del injerto, pero la presencia de ambos en un mismo paciente incrementa hasta 6,6 veces el riesgo de pérdida del injerto<sup>17</sup>. Sin embargo la relación entre el CMV y el rechazo es bidireccional, pues el tratamiento del rechazo consiste en incrementar la inmunosupresión y esto puede favorecer la replicación viral, mientras que el tratamiento de la reactivación viral consiste en un descenso de la inmunosupresión que podría aumentar el rechazo del injerto. En nuestro trabajo los pacientes con infección/enfermedad por CMV tuvieron más episodios de rechazo agudo pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Cuando se analizó la mortalidad a largo plazo, los pacientes con infección/enfermedad por CMV presentaron una supervivencia inferior que los pacientes sin reactivación viral, sin embargo el análisis multivariante no mostró asociación significativa entre la infección/enfermedad por CMV y la mortalidad a largo plazo, hecho similar a lo descrito en otros trabajos<sup>20,30,31</sup>. Desde hace años hay

evidencias de una posible asociación entre el CMV y la enfermedad cardiovascular<sup>32,33</sup>, sobre todo en ausencia de estrategias de prevención. Courivaud et al.<sup>34</sup> demostraron, en 570 pacientes trasplantados de riñón que recibieron profilaxis con valaciclovir, que los pacientes que presentaron replicación viral postrasplante tenían un mayor riesgo de mortalidad y de eventos ateroscleróticos postrasplante que aquellos que no tuvieron replicación viral, con una media de seguimiento de 7 años. En nuestro estudio cuando analizamos la asociación entre el CMV y los eventos cardiovasculares no encontramos diferencias estadísticamente significativas aunque sí se vio que había una mayor tendencia a sufrir un evento cardiovascular postrasplante entre los pacientes con infección/enfermedad por CMV.

Esto apoya la idea de que el uso de las estrategias de prevención se basen no sólo en reducir la incidencia de infección/enfermedad por CMV y su más severa consecuencia, que es la mortalidad por enfermedad por CMV, sino que también traten de prevenir la aparición de efectos indirectos entre los que se encuentra la mortalidad global y cardiovascular.

La activación del CMV postrasplante produce un daño en el injerto y en el paciente que se asocia con mayor riesgo de pérdida del injerto a largo plazo, por lo que los intentos por mejorar su prevención ayudarían a progresar en los resultados a largo plazo. Así mismo, con los datos que se derivan de este y otros estudios habría que considerar a los pacientes que tienen infección o enfermedad por CMV como pacientes con mayor riesgo de pérdida del injerto y mortalidad, por lo que deberían ser seguidos de forma cercana desde el punto de vista clínico en general y de la función renal, extremando las alertas sobre adherencia y minimización del tratamiento inmunosupresor y realizando una monitorización clínica cardiovascular más estrecha. Esto podría ayudar a mejorar la supervivencia a largo plazo.



## 2. - Papel de la inmunidad adaptativa en el control de la infección o enfermedad por CMV tras el trasplante renal.

El CMV puede dar lugar a una infección autolimitada o, en ausencia de control inmunológico o tratamiento antiviral, puede causar infección activa o enfermedad. El control inmunológico del CMV en los pacientes inmunosuprimidos es complejo y en él están involucrados tanto el sistema inmune innato como el adaptativo. La respuesta celular específica frente al CMV y la activación de las células NK se correlaciona con la capacidad del paciente para controlar la replicación viral<sup>44-46,69-72</sup>.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que la presencia de inmunidad celular específica pretrasplante frente al antígeno viral IE-1 protege de la replicación viral postrasplante en pacientes seropositivos en los que no se realiza tratamiento de inducción con timoglobulina y por lo tanto no tienen una depleción exhaustiva de células del sistema inmune, y que la presencia de inmunidad celular pretrasplante frente a los antígenos IE-1 y pp65 protege de la replicación viral en pacientes seronegativos o seropositivos en los que sí se utiliza un preacondicionamiento con anticuerpos policlonales anti-linfocitarios. La evaluación de la respuesta T específica frente al CMV antes del trasplante podría ser una herramienta útil para predecir pacientes en riesgo y serviría de guía en la prevención de la infección o enfermedad por CMV postrasplante.

En nuestro estudio, los pacientes con riesgo intermedio de infección por CMV y con tratamiento anticipado como estrategia de prevención, un porcentaje de linfocitos T CD8 activados frente al antígeno viral IE-1 por encima de 0,05% representa un nivel de protección suficiente para evitar la replicación viral postrasplante. Como consecuencia de esto, los pacientes con un riesgo intermedio, que no van a recibir timoglobulina como inducción, y con un porcentaje de linfocitos T CD8 frente a IE-1 pretrasplante por

debajo de 0,05 serían candidatos a recibir profilaxis universal como estrategia de prevención o utilizar de forma precoz los inhibidores mTOR como inmunosupresión de mantenimiento, asociado o no a un inhibidor de calcineurina.

En el caso de los pacientes seronegativos y de los seropositivos que reciben tratamiento de inducción con anticuerpos anti-linfocitarios (timoglobulina) la ausencia o una baja respuesta pre-trasplante T CD8 frente al antígeno IE-1 y T CD8 y CD4 frente al antígeno pp65 se asocia de forma estadísticamente significativa con la replicación viral postrasplante. El uso de la timoglobulina como tratamiento de inducción hace que la reconstitución del sistema inmune después del trasplante sea más lenta, especialmente la de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>70</sup>. Este hecho unido a una frecuencia basal baja de linfocitos T específicos frente al CMV explicaría que en este grupo de pacientes, tanto el porcentaje pretrasplante de CD8 como de CD4 específicos de CMV sean determinantes en la predicción del riesgo de CMV postrasplante.

Estudios previos, donde evalúan la inmunidad celular mediante la medición de IFN- $\gamma$  intracelular por citometría de flujo, obtienen resultados similares al nuestro. Bunde et al<sup>57</sup> evalúan la inmunidad celular específica frente al CMV en pacientes trasplantados de corazón y pulmón y muestran que una frecuencia elevada de células T CD8 específicas frente a IE-1 antes del trasplante se correlaciona con protección frente al desarrollo postrasplante de enfermedad por CMV.

Gerna et al<sup>70</sup>. también monitorizan la respuesta inmune celular en 38 pacientes trasplantados de órgano sólido (20 de corazón, 9 de pulmón y 9 de riñón) mediante la medición intracelular de IFN- $\gamma$  y demuestran que los pacientes con ausencia de inmunidad celular específica en el primer mes postrasplante desarrollan con más frecuencia infección por CMV que requiere tratamiento antiviral comparado con los

pacientes con presencia de inmunidad celular específica en el primer mes que generalmente controlan la infección espontáneamente. Este estudio lo realizaron utilizando células dendríticas autólogas infectadas con una cepa salvaje de CMV como estímulo para la detección *ex vivo* de las células T específicas de CMV. Este método es difícil de aplicar en la práctica clínica diaria pues requiere 7 días para su desarrollo completo y los pacientes severamente leucopénicos suponen una dificultad para la generación de células dendríticas.

Por este motivo, los mismos autores decidieron comparar en otro estudio<sup>153</sup> la estimulación directa de las células mononucleares de sangre periférica con los antígenos virales pp65 e IE-1, que requiere 24 horas, con la estimulación derivada de las células dendríticas infectadas, que requiere 7 días. Realizaron el estudio en 20 pacientes trasplantados (9 de corazón, 8 de pulmón y 3 de riñón) y demostraron que los pacientes con infección por CMV que requirió tratamiento antiviral presentaban ausencia precoz (en los primeros 30 días postrasplante) de respuesta T específica frente al CMV en su conjunto, representado por células dendríticas autólogas infectadas, y frente a los antígenos pp65 e IE-1, mientras que los pacientes con infección autolimitada presentaban una respuesta específica precoz tanto al CMV completo como a los antígenos virales pp65 e IE-1. La respuesta T específica estaba presente en la totalidad de los pacientes cuando se estimulaban las PBMCs con células dendríticas infectadas con CMV mientras que el número de pacientes con respuesta T específica frente a los antígenos pp65 e IE-1 fue inferior. Esto indica que en algunos pacientes la respuesta T específica frente al CMV está dirigida frente a otras proteínas virales diferentes de pp65 e IE-1 y por tanto en algunas ocasiones el estudio de la respuesta inmune dirigida solamente frente a pp65 e IE-1 puede subestimar la verdadera capacidad del paciente para controlar el virus.

Este estudio resalta la importancia de procurar estimular las PBMCs con un amplio número de proteínas virales y la necesidad de detectar simultáneamente la respuesta específica T CD4 y CD8 para conseguir una adecuada información de la inmunoprotección de cada paciente y concluyen que el uso de lisados de células infectadas como fuente de antígenos puede ser una alternativa válida para la detección de la inmunidad específica frente al CMV y se disminuiría el riesgo de subestimar la capacidad de cada paciente de controlar el CMV. Pero hay que destacar que, el hecho de estudiar la respuesta global puede enmascarar la ausencia de respuesta frente a antígenos virales esenciales en el control de la replicación viral y que el análisis de la respuesta inmune lo realizan en los primeros 30 días postrasplante y no en el momento pretrasplante.

Por otro lado, el seguimiento inmunológico de los pacientes debe ser sencillo y aportar información rápida a los clínicos para poder mejorar en el manejo de esta complicación postrasplante por lo que el uso de métodos que consuman un excesivo tiempo, que requieran un conocimiento específico sobre el manejo del virus o que sean laboriosos y utilicen tecnologías avanzadas pueden hacer que el test no se pueda aplicar de forma universal en la práctica clínica diaria.

Existen otros ensayos que analizan la liberación de IFN- $\gamma$  para estudiar la respuesta específica de células T, como son el ELISpot (ensayo Spot inmunoabsorbente ligado a enzimas) y el Quantiferon (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Los más usados se desarrollaron inicialmente para la detección de la respuesta frente a *Mycobacterium tuberculosis* y son el T-SPOT TB y el Quantiferon-TB y están aprobados por la FDA. Estos mismos tests se han desarrollado para determinar la inmunidad celular T frente al CMV y se han utilizado en pacientes trasplantados tanto en el campo clínico como en investigación. Las principales diferencias entre estos dos

métodos son<sup>156</sup>: (i) el estímulo antigénico selecciona, en el caso del Quantiferon sólo células T-CD8 y en el caso del ELISpot células T-CD4 y CD8 simultáneamente, (ii) el Quantiferon evalúa la producción de IFN- $\gamma$  en un 1 ml de sangre total y el ELISpot lo hace en un número determinado de PBMCs aislados de la sangre y (iii) el Quantiferon mide la producción de IFN- $\gamma$  en unidades internacionales y el ELISpot en colonias formadoras de “spots” o puntos, o lo que es lo mismo, clones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ . Una de las limitaciones en el uso del Quantiferon es que contiene un grupo de péptidos que son presentados por los alelos HLA de clase I más frecuentes en la población, por lo que pacientes con HLA poco comunes pueden dar lugar a un test falsamente negativo.

Los resultados obtenidos cuando se han aplicado estos dos métodos son similares a lo descrito anteriormente con el estudio de la inmunidad celular específica mediante la medición de IFN- $\gamma$  intracelular por citometría de flujo.

En este sentido, autores españoles han contribuido al avance con estos dos métodos. Por un lado, Bestard et al<sup>72</sup> analizaron la respuesta inmune celular específica de CMV utilizando el ELISpot en ciento treinta y siete pacientes trasplantados de riñón en el momento antes del trasplante y demostraron que los pacientes que presentaron infección por CMV postrasplante mostraban una respuesta celular T frente a IE-1 pre-trasplante significativamente inferior que la de los pacientes que no desarrollaron infección por CMV postrasplante. Hallazgos similares se han observado en sucesivos estudios<sup>154,155</sup> por otros autores, en los que se ha utilizado el mismo método funcional de células T. Por otro lado, Cantisán et al<sup>71</sup> evaluaron la inmunidad celular específica de CMV con el Quantiferon en cuarenta y cuatro pacientes seropositivos para CMV trasplantados de pulmón y riñón, y observaron que los pacientes con un test pre-trasplante no reactivo ( $< 0,2$  UI/ml de IFN- $\gamma$ ) presentaban una incidencia de infección

por CMV significativamente superior que la de los pacientes con un test reactivo ( $\geq 0,2$  UI/ml de IFN- $\gamma$ ) pre-trasplante. Cuando se comparan ambos métodos, en pacientes trasplantados, muestran una correlación inversa similar con el desarrollo de infección por CMV y una especificidad y sensibilidad similar en la predicción del riesgo de infección por CMV postrasplante<sup>156</sup>.

En conjunto, todos estos estudios muestran que la evaluación de la respuesta celular T específica de CMV predice el riesgo de replicación viral post-trasplante independientemente del ensayo funcional de células T empleado y podrían ayudar al médico clínico a identificar con mayor criterio aquellos pacientes en riesgo de desarrollar infección por CMV postrasplante y en consecuencia a utilizar la estrategia de prevención más adecuada según la capacidad inmunológica del paciente de controlar el virus. Además de este dato es importante interpretar el resultado de la inmunidad celular en función de si el paciente va a recibir o no tratamiento de inducción y del tipo de fármaco empleado en la inducción, pues como se observa en nuestro estudio el análisis es diferente. La timoglobulina es un fármaco policlonal anti-linfocitorio que se usa cada vez con más frecuencia como inducción en el trasplante renal y produce una importante deplección de las células del sistema inmune que tardan en recuperarse varios meses después del trasplante. Otro de los fármacos que se emplea como tratamiento de inducción es el basiliximab que produce una inhibición de la proliferación del linfocito T a través del bloqueo del receptor de la interleuquina 2. Este fármaco no provoca eliminación del linfocito T sino disminución de su proliferación. En nuestro estudio, los pacientes que reciben tratamiento de inducción con basiliximab y tienen pretrasplante una ausencia de linfocitos T CD8 específicos frente a IE-1 presentan mayor riesgo de infección por CMV postrasplante. Sin embargo en los pacientes que reciben tratamiento de inducción con timoglobulina el riesgo de

replicación viral viene representado por la ausencia pretrasplante de respuesta T CD8 a IE-1 y ausencia de respuesta T CD4 y CD8 a pp65. Otros estudios donde se evalúa la respuesta inmune T frente al CMV<sup>71,72</sup> exponen los resultados de forma global, no diferenciando los resultados en función de si el paciente recibe o no tratamiento de inducción y del fármaco empleado, hecho que es relevante cuando se trata de evaluar células inmunológicas.

### **3. - Papel de la inmunidad innata en el control de la infección o enfermedad por CMV tras el trasplante renal.**

En el campo del trasplante, las células NK desempeñan un papel importante en la protección inicial frente a las infecciones virales, especialmente cuando el sistema inmune adaptativo no está del todo activo a consecuencia de la inmunosupresión, y en la vigilancia anti-tumoral en los periodos tardíos del trasplante cuando el desarrollo de tumores, asociados o no a la inmunosupresión, pueden ocurrir.

El comportamiento de la célula NK frente a la célula infectada o tumoral depende del balance de expresión de receptores activadores e inhibidores en su membrana celular. Existen dos grandes familias, los receptores KIR (receptores Ig-like) y los NKG2 (receptores lectinas tipo C) y en función de las moléculas a las que están asociadas en su vertiente intracitoplasmática pueden comportarse como receptores activadores o inhibidores de la célula NK.

El papel de las células NK en el campo del trasplante ha sido estudiado inicialmente en los pacientes trasplantados de médula ósea, donde se evidenció que aquellos pacientes que recibieron médula ósea de donantes con un mayor número de receptores activadores KIRs y una ausencia de ligandos HLA en el receptor para los receptores KIR inhibidores del donante se asociaba con menores tasas de infección por

CMV<sup>157,158</sup>. Paralelamente en los pacientes trasplantados de órgano sólido diversos estudios sugerían que combinaciones específicas de receptores KIR y ligandos HLA clase I entre el donante y el receptor podrían influir en los resultados a corto plazo del injerto renal<sup>159</sup>. Posteriormente trabajos realizados en cohortes retrospectivas de pacientes trasplantados de riñón confirmaban estos hallazgos de tal forma que aquellos pacientes con mayor número de receptores KIR activadores y menor número de ligandos HLA de los receptores KIR inhibidores se asociaba con un efecto protector frente a la infección por CMV postrasplante<sup>46-50</sup>.

La implicación de la familia de receptores NKG2 en la infección por CMV fue evidenciada por Gumá et al<sup>160</sup> en una cohorte de 70 individuos sanos en los que analizaron la expresión de los receptores CD94/NKG2C, CD94/NKG2A y NKG2D, además de otros receptores de la familia KIR, en linfocitos T y células NKs. Observaron que los pacientes seropositivos para CMV presentaban una frecuencia significativamente mayor de células T y NK positivas para NKG2C que los pacientes seronegativos, mientras que no encontraron relación entre el estado serológico para CMV y el porcentaje de células T o NK expresando el resto de receptores NKG2 o KIR analizados.

Este aumento de células NK que expresan el receptor NKG2C también fue evidenciada por Hadaya et al<sup>46</sup> en el momento de la infección por CMV postrasplante en un pequeño grupo de pacientes trasplantados de riñón seropositivos (N=11) y seronegativos (N=6) comparado con aquellos pacientes seropositivos que no presentaron reactivación viral postrasplante, en los cuales no se produjo expansión de dicho receptor en el periodo de evaluación (primeros 6 meses postrasplante). Trabajos posteriores en individuos sanos (N=52) y trasplantados de órgano sólido (N=12) han confirmado estos hallazgos y han profundizado en la caracterización del fenotipo de



estas células con la adquisición de marcadores madurativos durante el proceso de expansión<sup>161</sup>. Una característica común de estos estudios en pacientes trasplantados de riñón y otros órganos fue que los pacientes no recibieron tratamiento de inducción o si lo recibían empleaban anticuerpos monoclonales anti-IL2R.

Actualmente la mayor parte de los trasplantes renales se realizan bajo un régimen inmunosupresor de inducción, que puede ser con anticuerpos monoclonales (anti-IL2R o alemtuzumab) o anticuerpos policlonales (anticuerpos antilinfocitarios), seguido de un tratamiento de mantenimiento que consiste habitualmente en triple terapia con esteroides, ácido micofenólico e inhibidor de la calcineurina (tacrolimus).

La funcionalidad y el número de células NK se ve influenciado por el tratamiento inmunosupresor tanto de inducción como de mantenimiento. Aunque existen trabajos contradictorios en este sentido, una mayor parte de ellos coinciden en que el uso de tacrolimus o ciclosporina en los pacientes trasplantados se asocia con una inhibición de la activación de las células NKs<sup>162-164</sup> y que el uso de alemtuzumab<sup>165</sup> o timoglobulina<sup>50</sup> se asocia con una disminución temporal del número de células NK comparado con los anti-IL2R.

En nuestro estudio evaluamos la expresión de los receptores de la familia NKG2 en linfocitos T y células NK en dos cohortes de pacientes trasplantados de riñón y su asociación con la presencia de replicación viral postrasplante. Los dos grupos de pacientes se diferencian por el tratamiento de inducción recibido: anti-IL2R *vs.* timoglobulina y la estrategia de prevención frente al CMV utilizada: terapia anticipada *vs.* profilaxis universal.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que en los pacientes seropositivos para CMV que reciben tratamiento de inducción con anti-IL2R y terapia

anticipada como estrategia de prevención frente al CMV, la presencia antes del trasplante de un elevado porcentaje de células NK que expresan el receptor activador CD94/NKG2C protegería de la replicación viral postrasplante, mientras que un elevado porcentaje de linfocitos T que expresan el receptor inhibidor CD94/NKG2A podría favorecer la replicación viral. Sin embargo la expresión del receptor NKG2D en la muestra pre-trasplante no mostró diferencias entre los pacientes con o sin infección por CMV.

Al igual que en los estudios analizados previamente los pacientes que presentaron infección por CMV presentaron un incremento en el porcentaje de células NK positivas para el receptor NKG2C después de la infección mientras que los pacientes que no replicaronn mantuvieron estable el porcentaje de células NK positivas para NKG2C a lo largo del primer año postrasplante.

El comportamiento de la expresión de estos receptores en los pacientes seropositivos o seronegativos que recibieron tratamiento de inducción con timoglobulina y utilizaron profilaxis universal como estrategia de prevención frente al CMV fue diferente a lo mencionado anteriormente. No encontramos diferencias en la expresión pre-trasplante de ninguno de los 3 receptores evaluados (CD94/NKG2C, CD94/NKG2A y NKG2D) entre los pacientes con o sin infección por CMV postrasplante, tanto en los pacientes seropositivos como en los seronegativos, posiblemente derivado del efecto del tratamiento de inducción con timoglobulina. En los pacientes seronegativos observamos una mayor expresión del receptor CD94 /NKG2C y NKG2D en el momento de la replicación viral con respecto al valor pre-trasplante manteniéndose elevado hasta un año después del trasplante, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo.

En conjunto, nuestros resultados indican que la evaluación de la inmunidad innata, mediante la determinación de la expresión de los receptores de la familia NKG2, antes del trasplante y a lo largo del seguimiento puede ser importante para identificar pacientes con mayor riesgo de presentar infecciones virales en la etapa precoz postrasplante. Estos hallazgos, junto con los aportados por otros grupos en los que analizan el número de células NK postrasplante y la funcionalidad de las mismas, mediante la determinación de los receptores KIR, podrían ayudar a definir pacientes en riesgo de desarrollar infección por CMV postrasplante y en consecuencia utilizar la estrategia de prevención más adecuada o un régimen inmunosupresor menos potente si la situación inmunológica del paciente lo permite. Este hecho también podría extenderse al periodo tardío del trasplante donde las células NK juegan un papel importante en la vigilancia anti-tumoral, por lo que el mantener a largo plazo una funcionalidad adecuada de las células NK puede ser útil en la defensa frente a los tumores.

#### **4. - Cómo aplicar la monitorización inmunológica en la práctica clínica habitual.**

##### **Propuesta de ensayo clínico**

Para controlar el CMV postrasplante son necesarias por un lado, estrategias que mejoren la respuesta inmune del paciente, y por otro lado herramientas diagnósticas que definan con mayor precisión el actual riesgo de infección. La combinación de cada una de ellas serviría para mejorar el cuidado de los pacientes y disminuiría los efectos nocivos derivados de la presencia de la replicación del CMV postrasplante.

En este sentido, los resultados derivados de la monitorización inmunológica apoyan que, además del estudio de la inmunidad humoral, la medición de la inmunidad celular específica y de la inmunidad innata frente al CMV antes del trasplante son herramientas útiles en la evaluación y estratificación del riesgo de infección por CMV de los pacientes candidatos a un trasplante de órgano sólido.

La aplicación de la monitorización inmunológica posiblemente tenga que realizarse de acuerdo al tratamiento inmunosupresor de inducción y mantenimiento recibido. El efecto sobre el porcentaje de linfocitos T y células NK que ejerce el uso de anticuerpos monoclonales como basiliximab es diferente al ejercido por anticuerpos antilinfocitarios como la timoglobulina. Del mismo modo el uso de tacrolimus o ciclosporina tienen un mayor efecto supresor sobre los linfocitos T y células NK que los inhibidores de mTOR.

Existe suficiente evidencia científica que sugiere que los pacientes que usan inhibidores de mTOR tienen un menor riesgo de presentar infección o enfermedad por CMV postrasplante. Estos fármacos inmunosupresores forman parte del arsenal terapéutico habitual que se emplea en el paciente trasplantado para prevenir la aparición de rechazo agudo y han demostrado tener un perfil protector frente a la replicación viral en estudios procedentes de ensayos clínicos, estudios epidemiológicos, revisiones sistemáticas y meta-análisis,<sup>142,166</sup> a pesar de que en la mayoría de estos estudios el análisis de la infección por CMV postrasplante no era el objetivo principal y no estaban diseñados para ello.

Recientemente Tedesco-Silva et al<sup>167</sup>. en un estudio randomizado compararon la incidencia de infección por CMV en pacientes trasplantados de riñón que recibieron anticuerpos anti-linfocitarios – tacrolimus - everolimus frente a pacientes con basiliximab - tacrolimus - everolimus y pacientes con basiliximab – tacrolimus – ácido micofenólico. Todos ellos con terapia anticipada como estrategia de prevención y mostraron que los pacientes en los que se usó everolimus la incidencia de infección por CMV fue claramente inferior que en el grupo de pacientes que no usaron dicho fármaco (anti-linfocitarios – tacrolimus - everolimus vs. basiliximab – tacrolimus - ácido micofenólico: 4.7% vs. 37.6%, HR 0.10, 95% IC 0.037–0.29; P<0.001; basiliximab –

tacrolimus - everolimus vs. basiliximab – tacrolimus - ácido micofenólico: 10.8% vs. 37.6%, HR 0.25, 95% IC 0.13–0.48;  $P < 0.001$ ).

Existen varios mecanismos que podrían explicar este efecto. En primer lugar por un mecanismo directo sobre el complejo mTOR C-1, inhibiéndolo. Este complejo es utilizado por el virus para la síntesis de proteínas virales necesarias para la replicación viral, por lo que su inhibición impediría la síntesis de estas proteínas y por tanto la replicación viral<sup>11</sup>. En segundo lugar por un efecto inmunomodulador del fármaco tanto a nivel de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Se ha demostrado en estudios experimentales que el tratamiento con inhibidores mTOR produce un incremento en el número de LT específicos de antígeno disminuyendo su apoptosis y a nivel de la inmunidad innata produce un incremento de citoquinas proinflamatorias y una disminución de citoquinas anti-inflamatorias que ayudarían a controlar la infección viral<sup>12-14</sup>.

Otra de las estrategias que mejorarían la respuesta inmune del paciente sería el uso de una vacuna eficaz frente al CMV en pacientes seronegativos y en aquellos pacientes seropositivos que tengan ausencia de inmunidad celular específica frente a dicho virus. Sin embargo, actualmente el desarrollo de la vacuna no está disponible para su uso generalizado.

**Propuesta de futuro:** La combinación de estas estrategias descritas anteriormente nos ayudarían a controlar mejor los episodios de replicación viral, reducirían el coste económico que se deriva de la profilaxis universal y de los cuidados de los pacientes con infección o enfermedad por CMV y mejorarían los resultados a largo plazo.

Pero, queda aún un camino por recorrer ya que existen situaciones clínicas que no han sido exploradas en estudios randomizados.

Basándonos en la filosofía de la medicina de precisión y utilizando las estrategias disponibles actualmente, como son el uso de los fármacos antivirales, el uso de los inhibidores mTOR y la medida de la inmunidad celular específica proponemos el diseño de un estudio randomizado que tenga por objeto comparar el uso temprano de inhibidores mTOR acompañado de dosis reducidas de tacrolimus y terapia anticipada vs. ácido micofenólico, tacrolimus y profilaxis universal en pacientes R+ con riesgo de desarrollar infección por CMV postrasplante, determinado mediante el análisis pre-trasplante de la inmunidad celular específica frente al CMV, y que reciben tratamiento de inducción con timoglobulina o basiliximab (Figura 41).

Este estudio:

- Permitiría un tratamiento simultáneo: inmunosupresor y preventivo de la replicación del CMV con inhibidores mTOR.
- Permitiría aplicar una terapia personalizada, basada en un diagnóstico personalizado.
- Podría ser extrapolable a otros órganos, con especial relevancia en trasplante cardiaco y pulmonar dada las importantes implicaciones de la enfermedad por CMV en estos órganos.
- Posibilitaría un ahorro económico, porque se evitaría el uso de valganciclovir y se utilizaría everolimus (inhibidor mTOR) junto con otros inmunosupresores (tacrolimus y esteroides) como parte del tratamiento inmunosupresor inicial.
- Y permitiría reducir los efectos adversos derivados del uso de valganciclovir, fundamentalmente el de leucopenia (neutropenia) que es frecuente en estos pacientes.

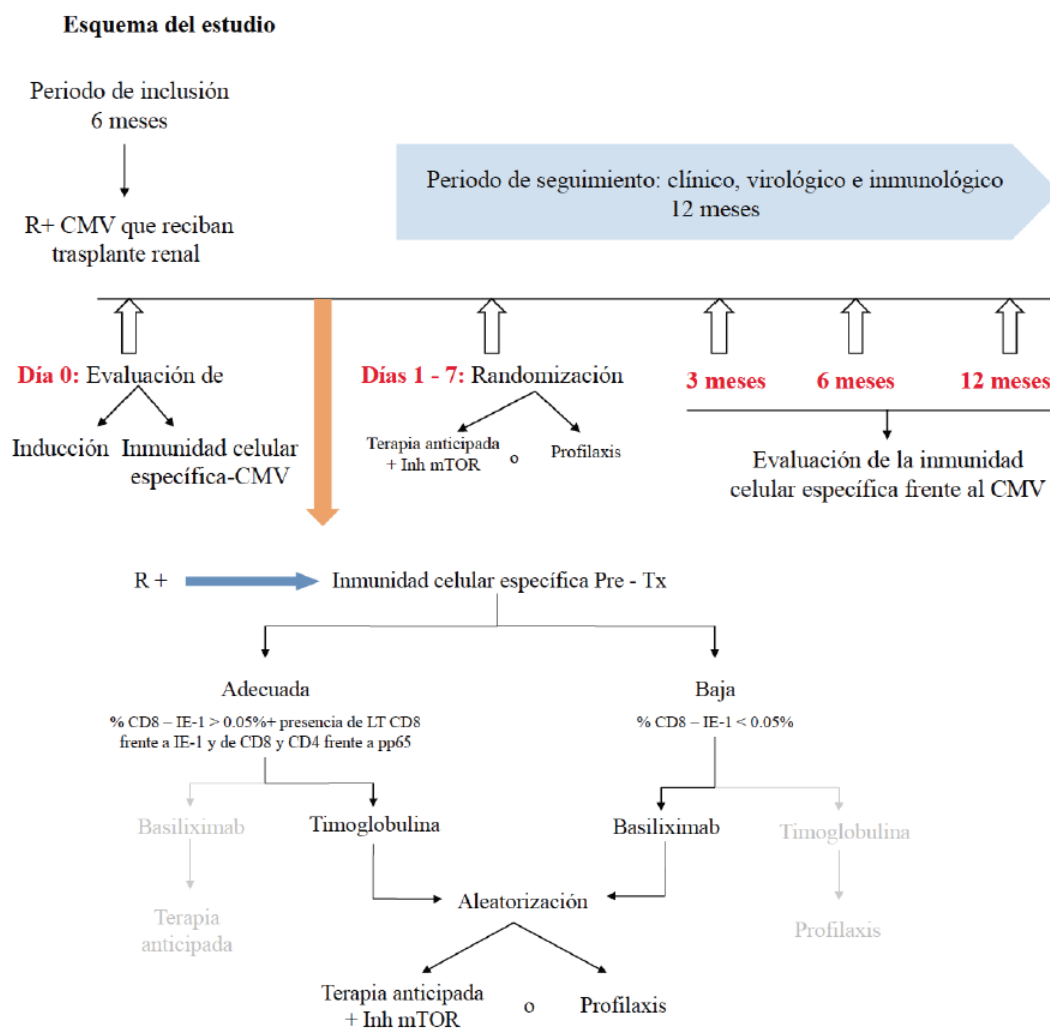


Figura 41: Diseño de estudio clínico para evaluar el efecto que tiene sobre la incidencia de infección por CMV durante el primer año postrasplante, una estrategia de prevención frente al CMV basada en el uso temprano de everolimus más dosis reducidas de tacrolimus junto con terapia anticipada en pacientes R+ con un riesgo intermedio de infección por CMV definida por la inmunidad celular específica antes del trasplante versus el tratamiento estándar con tacrolimus, micofenolato y profilaxis universal.

## 5. – Limitaciones y fortalezas

El estudio retrospectivo clínico tiene algunas limitaciones: Por un lado su naturaleza unicéntrica, que aunque puede favorecer la uniformidad de las acciones, limita la extrapolación de resultados. Esto no reduce la validez de los mismos, pero su interpretación requiere considerar las condiciones y circunstancias locales. Y por otro lado su condición retrospectiva que sólo nos permite especular sobre potenciales

razones que expliquen las diferencias observadas entre los dos grupos. Sin embargo el estudio tiene el valor del largo periodo de seguimiento (mediana de 8 años de seguimiento), fundamental cuando se analiza el éxito del trasplante y la homogeneidad del equipo médico que se encargaba del cuidado de los pacientes.

El estudio prospectivo está limitado igualmente, por su naturaleza unicéntrica, y por el tamaño de la muestra. Sin embargo, la naturaleza prospectiva del estudio y la homogeneidad de los pacientes evaluados hacen que el estudio cobre fuerza. No obstante, se necesitarían otros estudios que incluyeran más pacientes y que englobaran diferentes centros con el propósito de confirmar esta hipótesis.



## **CONCLUSIONES**



I. La incidencia de infección y enfermedad por CMV en una cohorte de pacientes trasplantados de riñón en España, utilizando estrategias de prevención en función del riesgo pretrasplante definido por la combinación serológica para CMV entre el donante y el receptor, fue del 34,7% y 9,5% respectivamente.

II. La infección o enfermedad por CMV tras el trasplante disminuye la supervivencia del injerto y del paciente a largo plazo, comportándose como un factor de riesgo de pérdida del injerto pero no de mortalidad.

III. La presencia pretrasplante de inmunidad celular T – CD8 frente al antígeno viral IE-1  $< 0,05\%$  es un factor de riesgo de infección por CMV postrasplante en los pacientes seropositivos para CMV que reciben tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales anti-IL2R (basiliximab).

IV. La presencia pretrasplante de un porcentaje disminuido de células NK con expresión del receptor activador NKG2C es un factor de riesgo de replicación viral postrasplante en pacientes seropositivos para CMV que reciben tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales anti-IL2R (basiliximab).

V. La presencia pretrasplante de un porcentaje elevado de linfocitos T con expresión del receptor inhibidor NKG2A es un factor de riesgo de replicación viral postrasplante en

pacientes seropositivos para CMV que reciben tratamiento de inducción con anticuerpos monoclonales anti-IL2R (basiliximab).

VI. La ausencia pretrasplante de inmunidad celular T – CD8 frente al antígeno viral IE-1 y la ausencia de inmunidad T – CD8 y CD4 frente al antígeno pp65 es un factor de riesgo de infección por CMV en los pacientes seropositivos que reciben tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales anti-linfocitarios.

VII. En los pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales anti-linfocitarios, el estudio de la inmunidad innata no discrimina aquellos pacientes con más riesgo de infección o enfermedad por CMV postrasplante.

VIII. En los pacientes seronegativos el estudio pretrasplante de la inmunidad celular específica T CD8 y CD4 frente a los antígenos virales IE-1 o pp65 no predice pacientes con mayor riesgo de infección o enfermedad por CMV postrasplante.

IX. La infección o enfermedad por CMV en los pacientes seronegativos produce una expansión de las células NK y linfocitos T que expresan el receptor activador CD94/NKG2C y NKG2D.

X. La monitorización conjunta pretrasplante de la inmunidad celular específica frente al antígeno viral IE-1 y de la expresión de receptores de la familia NKG2 en células NK y linfocitos T, en los pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción con anti-IL2R (basiliximab), es una estrategia útil para identificar pacientes en riesgo de desarrollar infección o enfermedad por CMV postrasplante.

XI. La monitorización pretrasplante de la inmunidad celular específica frente a los antígenos virales IE-1 y pp65, en los pacientes seropositivos que van a recibir tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales anti-linfocitarios, es una herramienta útil para identificar pacientes en riesgo de desarrollar infección o enfermedad por CMV postrasplante.

XII. Estos hallazgos permiten diseñar un estudio clínico randomizado basado en la monitorización inmunológica pretrasplante para comparar la combinación de estrategias basadas en un tratamiento personalizado contra el CMV frente al tratamiento habitual.



## **REFERENCIAS**





1. - Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 2013; 382 (9888): 260 - 272.
2. - Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(7): 2034 – 2047.
3. - Stevens PE, Levin A; Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group Members. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*, 2013, 4; 158 (11): 825 - 830.
4. - Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int*, 2014; 85(1): 49 – 61.
5. - Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrologia*, 21; 34 (3): 302 – 316.
6. - P. Schnuelle, D. Lorenz, M. Trede, et al. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *JASN*, 1998; 9: 2135 – 2141.

7. - Pippias M, Stel VS, Abad Diez JM, Afentakis N, Herrero-Calvo JA, Arias M. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2012 ERA-EDTA Registry Annual Report. Clin Kidney J, 2015; 8(3): 248 – 61
8. - Hart, J. M. Smith, M. A. Skeans, S. K. Gustafson, D. E. Stewart, W. S. Cherikh et al. OPTN/SRTR 2014 Annual Data Report: kidney. Am J Transplant. 2016; 16 Suppl 2: 11 – 46.
9. - Pérez-Sáez MJ, Arcos E, Comas J, Crespo M, Lloveras J, Pascual J. Survival Benefit From Kidney Transplantation Using Kidneys From Deceased Donors Aged  $\geq 75$  Years: A Time-Dependent Analysis. Am J Transplant. 2016 Sep;16(9):2724-33.
10. - M. Tonelli, N Wiebe, G. Knoll, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. AJT, 2011; 11: 2093 – 2109.
11. - K.E. Lamb, S. Lodhi et al. Long term renal allograft survival in the united states: a critical reappraisal. AJT, 2011; 11: 450 – 462.
12. – F. Moreso, D. Hernández. ¿Ha mejorado la supervivencia del injerto tras el trasplante renal en la era de la moderna inmunosupresión?. Nefrología, 2013;33(1):14–26.
13. - Ribbert H. Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. Zbl All Pathol 1904, 15:945–948.
14. - Jesionek A, Kiolemenoglou B. Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditär-luetischen Foetus. Muenchner Med W ochenschr 1904, 51:1905–1907.

15. - Monto Ho. The history of cytomegalovirus. *Med Microbiol Immunol* 2008, 197:65-73.
16. - Von Glahn WC, Pappenheimer AM. Intranuclear inclusions in visceral disease. *Am J Pathol* 1925, 1:445–465.
17. - Margaret G. Smith. Propagation in tissue cultures of a cytopatho- genic virus from human salivary gland virus (SVG) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956, 92:424–430.
18. - Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957, 94:4–12.
19. - Rowe WP, Hartley JW, Waterman S et al. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Pro Soc Exp Biol Med* 1956, 92:418–424.
20. - Klemola E, Kaariainen L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J* 1965; 2:1099–1102.
21. - Brennan D.C. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001, 12: 848-855.
22. – Jeffrey I. Cohen. Introducción a los Herpesviridae. En: John E. Bennet, Raphael Dolin, Martin J. Blaser, editores. *Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and practice of infectious diseases*. Edición en español. Barcelona. Elsevier; 2015. Capítulo 137, p 1793-1798.
23. – Clyde S. Crumpacker. Citomegalovirus. En: John E. Bennet, Raphael Dolin, Martin J. Blaser, editores. *Mandell, Douglas and Bennett’s Principles and practice of*

infectious diseases. Edición en español. Barcelona. Elsevier; 2015. Capítulo 140, p 1825-1842.

24. – Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 25; 100 (24): 14223–14228.

25. – Sanbonmatsu S. Pérez Ruiz M, Navarro Marí JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2014, 32 (Supl 1): 15-22.

26. – Nelson JA, Small RNAs and Large DNA viruses. *N Engl J Med*, 2007, 20; 357 (25): 2630-2.

27. - Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of cancer-norfolk cohort. *Clin Infect Dis*. 2013, 56:1421-7.

28. - Pass RF. Cytomegalovirus. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2675-705.

29. – Understanding human T-cell-mediated immunoregulation through herpesviruses. *Immunol Cell Biol* 2011, 89: 352-358.

30. - Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):143-54.

31. – Murphy K. Basics concepts in Immunology. En: Kenneth Murphy, Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport. *Janeway's Immunobiology*. 8<sup>th</sup> ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, 2012. Cap 1, p 1-36.

32. - Murphy K. Innate immunity: The first line of defense. En: Kenneth Murphy, Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport. Janeway's Immunobiology. 8<sup>th</sup> ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, 2012. Cap 2, p 37-74.
33. - Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. J Virol 2003; 77: 4588–4596.
34. - Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. J Immunol 2006; 177: 7094–7102.
35. - Seung H. Kang, Rima C. Abdel-Massih, Robert A. Brown, Ross A. Dierkhising, Walter K. Kremers, and Raymund R. Razonable. Homozygosity for the Toll-Like Receptor 2 R753Q Single-Nucleotide Polymorphism Is a Risk Factor for Cytomegalovirus Disease After Liver Transplantation. J Infect Dis. 2012, 15; 205(4): 639–646.
36. – Caligiuri MA. Human natural killer cells. Blood, 2008; 112: 461-469.
37. – Wilkinson G, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aichele R, et al. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. J Clin Virol, 2008, 41 (3): 206-212.
38. – Jackson SE., Mason GV., Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. Virus research, 2011, 157: 151-160.
39. – Revilla MJ, Wang R, Mans J, Hong M, Natarajan K, Margulies DH. How the virus outsmarts the host: Function and structure of cytomegalovirus MHC-I-like

molecules in the evasion of natural killer cell surveillance. *J biomed biotechnol*, 2011; 2011: 724607.

40. - Lanier LL. Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, 2008; 9: 495–502.

41. - López-Botet M, Angulo A, Gumá M. Natural killer cell receptors for major histocompatibility complex class I and related molecules in cytomegalovirus infection. *Tissue Antigens*, 2004; 63: 195–203.

42. - Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. and Lopez-Botet, M., Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, 2004, 104: 3664–3671.

43. - Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8: 259–268.

44. - Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med*, 1989; 320: 1731–1735.

45. - Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V, Finkelstein Y, Markel G, Katz G, Hanna J, Achdout H, Gruda R, Gonen-Gross T, Mandelboim O. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood*, 2004; 103(5): 1965-6.

46. - Hadaya K, de Rham C, Bandelier C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Berney T, Buhler L, Kaiser L, Seebach JD, Tiercy JM, Martin PY, Villard J. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008, 8(12): 2674-83.

47. - Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The number of activating KIR genes inversely correlates with the rate of CMV infection/reactivation in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008, 8(6): 1312-7.
48. - Jones DC, Peacock S, Hughes D, Traherne JA, Allen RL, Barnardo MC, Friend P, Taylor CJ, Fuggle S, Trowsdale J, Young NT. Killer immunoglobulin-like receptor gene repertoire influences viral load of primary human cytomegalovirus infection in renal transplant patients. *Genes Immun*. 2014, 15(8): 562-8.
49. - de Rham C, Hadaya K, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, Villard J. Expression of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) by natural killer cells during acute CMV infection after kidney transplantation. *Transpl Immunol*, 2014; 31(3): 157-64.
50. - Gonzalez A, Schmitter K, Hirsch HH, Garzoni C, van Delden C, Boggian K, Mueller NJ, Berger C, Villard J, Manuel O, Meylan P, Stern M, Hess C; Swiss Transplant Cohort Study. KIR-associated protection from CMV replication requires pre-existing immunity: a prospective study in solid organ transplant recipients. *Genes Immun*. 2014; 15(7): 495-9.
51. - Fernández-Ruiz M, Silva JT, López-Medrano F, Allende LM, San Juan R, Cambra F, Justo I, Paz-Artal E, Jiménez C, Aguado JM. Post-transplant monitoring of NK cell counts as a simple approach to predict the occurrence of opportunistic infection in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2016, 18(4): 552-65.
52. – Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, et al. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, 2008; 112: 1317–1324.

53. - Couzi L, Pitard V, Netzer S, et al. Common features of gamma delta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 2009; 200: 1415–1424.
54. - Kaminski H, Garrigue I, Couzi L, Taton B, Bachelet T, Moreau JF, Déchanet-Merville J, Thiébaud R, Merville P. Surveillance of  $\gamma\delta$  T Cells Predicts Cytomegalovirus Infection Resolution in Kidney Transplants. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27(2): 637-45.
55. - Knight A, Madrigal AJ, Grace S, Sivakumaran J, Kottaridis P, Mackinnon S, Travers PJ, Lowdell MW. The role of V $\delta$ 2-negative gd T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2010; 116: 2164–2172.
56. - Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Köhler H. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*, 2001, 15; 71(9): 1287-94.
57. - Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, Proesch S, Reinke P, Volk HD, Lehmkühl H, Kern F. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 2005, 201(7): 1031-6.
58. - Kern F, Sural IP, Faulhaber N, Frömmel C, Schneider-Mergener J, Schönemann C, Reinke P, Volk HD. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol*, 1999; 73(10): 8179-84.



59. - Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol*, 1996; 70(11): 7569-79.
60. - Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss PA. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis*. 2002, 185(8): 1025-34.
61. - Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*, 2005, 202(5): 673-85.
62. - Khan N, Shariff N, Cobbold M, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002; 169: 1984–1992.
63. - Derhovanessian E, Maier AB, Hahnel K, et al. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. *J Gen Virol* 2011, 92: 2746–2756.
64. - Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA. The cytomegalovirus-specific CD4+ T-cell response expands with age and markedly alters the CD4+ T-cell repertoire. *J Virol* 2007, 81: 7759–7765.

65. - Munks MW, Cho KS, Pinto AK, Sierro S, Klenerman P, Hill AB. Four distinct patterns of memory CD8 T cell responses to chronic murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2006, 177: 450– 458.
66. - Appay V, Dunbar PR, Callan M, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002; 8: 379– 385.
67. - Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, Wagner S, Mahendra P, Apperley J, Goldman J, Craddock C, Moss PA. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001, 97(5): 1232-40.
68. - Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*, 1991, 78(5):1373-80.
- 69.- Sester M, Sester U, Gärtner BC, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(10): 2577-84.
70. – Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, Pellegrini C, Meloni F, Rampino T. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006, 6(10): 2356-64.
71. - Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, González-Padilla M, Bueno L, Rivero A, Solana R, Torre-Cisneros J. Pretransplant

interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant*. 2013, 13(3): 738-45.

72. - Bestard O, Lucia M, Crespo E, Van Liempt B, Palacio D, Melilli E, Torras J, Llaudó I, Cerezo G, Taco O, Gil-Vernet S, Grinyó JM, Cruzado JM. Pretransplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013, 13(7): 1793-805.

73. - Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4<sup>+</sup> T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003, 101(7): 2686-92.

74. - Christmas, SE, Halliday D, Lawton N et al. Cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> T cells do not develop in all renal transplant recipients at risk of virus infection. *Transplant immunology* 2009, 22: 99-104

75. - Nickel P, Bold G, Presber F, Biti D, Babel N, Kreutzer S, Pratschke J, Schönemann C, Kern F, Volk HD, Reinke P. High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol*. 2009, 20(4): 238-42.

76. - Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med*. 1994, 179(5): 1713-7.

77. - Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55–116 (gB): Use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 1990, 64: 1079– 1085.

78. - Urban M, Klein M, Britt WJ, Hassfurth E, Mach M. Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* 1996, 77 (Pt 7): 1537–1547.
79. - Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128–131A complex. *J Virol* 2010, 84: 1005–1013.
80. - Amanna IJ, Slifka MK. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunol Rev* 2010, 236: 125–138.
81. - Aberle JH, Puchhammer-Stockl E. Age-dependent increase of memory B cell response to cytomegalovirus in healthy adults. *Exp Gerontol* 2012, 47: 654–657.
82. - Hakki M, Chou S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2011, 24(6): 605-11.
83. - Kuhn DE, Beall CJ, Kolattukudy PE. The cytomegalovirus US28 protein binds multiple CC chemokines with high affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 211: 325–330.
84. - Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001, 14: 123–133.
85. - Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietsky N, Mandelboim M, Mandelboim O. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol.* 2008, 9(9):1065-73.

86. - Ashiru O, Bennett NJ, Boyle LH, Thomas M, Trowsdale J, Wills MR. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol.* 2009, 83(23):12345-54.
87. - Saverino D, Ghiotto F, Merlo A, Bruno S, Battini L, Occhino M, Maffei M, Tenca C, Pileri S, Baldi L, Fabbi M, Bachi A, De Santanna A, Grossi CE, Ciccone E. Specific recognition of the viral protein UL18 by CD85j/LIR-1/ILT2 on CD8+ T cells mediates the non-MHC-restricted lysis of human cytomegalovirus-infected cells. *J Immunol.* 2004, 172(9): 5629-37.
88. - Wang EC, McSharry B, Retiere C, Tomasec P, Williams S, Borysiewicz LK, Braud VM, Wilkinson GW. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(11):7570-5.
89. - Noriega V, Redmann V, Gardner T, Tortorella D. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res.* 2012, 54(1-3): 140-51.
90. - Gredmark-Russ S, Söderberg-Nauclér C. Dendritic cell biology in human cytomegalovirus infection and the clinical consequences for host immunity and pathology. *Virulence.* 2012, 3(7): 621-34.
91. - Humar A, Kumar D, Gray M, Moussa G, Venkataraman S, Kumar R, Tipples GA. A prospective assessment of cytomegalovirus immune evasion gene transcription profiles in transplant patients with cytomegalovirus infection. *Transplantation.* 2007, 83(9):1200-6.
92. - Baldanti F, Silini E, Sarasini A, Talarico CL, Stanat SC, Biron KK, Furione M, Bono F, Palu G, Gerna G. 1995. A three-nucleotide deletion in the UL97 open reading

frame is responsible for the ganciclovir resistance of a human cytomegalovirus clinical isolate. *J Virol* 69: 796–800.

93. - Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, Biron KK, Chou S, Sarasini A, Slini E, Gerna G. 1996. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97 encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double resistant human cytomegalovirus strains from patients with AIDS. *J Virol* 70: 1390 – 1395.

94. - Scott GM, Isaacs MA, Zeng F, Kesson AM, Rawlinson WD. Cytomegalovirus antiviral resistance associated with treatment induced UL97 (protein kinase) and UL54 (DNA polymerase) mutations. *J Med Virol* 2004; 74:85–93.

95. - Fishman J.A. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *NEJM* 2007; 357: 2601-14.

96. – Morris PJ, Knechtle SJ. Kidney transplantation. Principles and practice. 7<sup>th</sup> edition. Panamericana

97. - Sagedal S, Nordal K.P, Hartmann A, Sund S, Scott H et al. The Impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *AJT* 2002; 2: 850-56.

98. - Schnitzler M.A, Lowell J.A, Hardinger K.L, Boxerman S.B, Brennan D.C. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *AJT* 2003; 3: 445-51.

99. - Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *AJT* 2013; 13: 93-106.

100. - Ho M, Suwansirikul S, Dowling JN, Youngblood LA, Armstrong JA. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1975, 293(22): 1109-12.
101. – Pahissa Berga A, Gavalda Santapau J. Infecciones en el paciente sometido a un trasplante de órgano sólido. En: Auxina Ruiz V, Moreno Guillén S, editors. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* Buenos Aires: Editorial panamericana; 2006. P. 1467-1485.
102. - María José Pérez-Sola, Juan José Castón, Rafael Solana, et al. Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, 26(1): 38-47.
103. - Castón Osorio J.J, Zurbano Goñi F. Efectos indirectos de la infección por citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 (Supl 6): 6-10.
104. – Montejo M. Definiciones y conceptos de interés en la infección por citomegalovirus: infección frente a enfermedad. Replicación, carga viral, profilaxis universal. Terapia anticipada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011, 29 (6): 4-5.
105. - Hodson E. M, Jones C.A, Webster A.C, Strippoli G, Barclay P et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2005; 365: 2105-15.
106. - Hartmann A, Sagedal S, Hjelmestaeth. The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: S15-S17.
107. - Hjelmestaeth J, Sagedal S, Hartmann A, Rollag H, Egeland T, et al. Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes

mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia* 2004; 47: 1550

108. - Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66: 329

109. - Sagedal S, Rollag H, Hartmann A. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients is associated with impaired survival irrespective of expected mortality risk. *Clin Transplant* 2007; 21: 309-13.

110. - Smedbraten YV, Sagedal S, Leivestad T, Mjoen G, Osnes K et al. The impact of early cytomegalovirus infection after kidney transplantation on long-term graft and patient survival. *Clin Transplant* 2014; 28: 120-26.

111. - Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J and Freifeld A. Meta-Analysis: The Efficacy of Strategies To Prevent Organ Disease by Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients. *Ann Intern Med* 2005; 143: 870-80.

112. - Schneeberger H, Aydemir S, Müller R, Illner WD, Pfeiffer M et al. Hyperimmunoglobulin prophylaxis, monitoring and preemptive ganciclovir treatment eliminate the risk of CMV infection to improve patient and renal allograft survival. *Transpl Int* 2000; 13: S354-S358.

113. - Guirado L, Rabella N, Díaz JM, Facundo C, Maderuelo A et al. Tratamiento profiláctico por cytomegalovirus en pacientes trasplantados renales mediante valganciclovir oral. *Nefrologia* 2008; 28 (3) 293-300.

114. - Opelitz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2015; 99: 1197-1202.



115. - Arthurs SK, Eid AJ, Pederson RA, Kremers WK, Cosio FG et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 840-6.
116. - Nett PC, Heisey DM, Fernández LA, Sollinger H and Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1036-1041.
117. – Pérez JL. Técnicas de monitorización de la infección por cytomegalovirus en los trasplantados de órgano sólido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011, 29 (6): 18-23.
118. – Baldanti F, Lilleri D, Gerna GG. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol*, 2008, 41: 237-241.
119. - W. Lawrence Drew. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2007, 20: 408-411.
120. - R.Solá, N. Rabella, L.L. Guirado et al. Relation between pp65 antigenemia, RT-PCR and viruria for cytomegalovirus detection in kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. 2005. 37,3768-3769.
121. - Karine Hadaya, Werner Wunderli, Christelle Deffernez, et al. Monitoring of Cytomegalovirus Infection in Solid-Organ Transplant Recipients by an Ultrasensitive Plasma PCR Assay. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 3757–3764
122. - Erice, A., M. A. Holm, P. C. Gill, S.et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in ultrasensitive assay may secure treatment termination for high risk polymorphonuclear blood leukocytes. *J. Clin. Microbiol.* 1992 30:2822–2825.

123. - Gerna, G., M. Zavattoni, F. Baldanti, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) leukodnaemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection. *Transplantation* 1998 65:1378–1385.
124. - Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med.* 2005,143(12): 870-80.
125. - Opelz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2015, 99(6):1197-202.
126. - Florescu DF, Qiu F, Schmidt CM, Kalil AC. A direct and indirect comparison meta-analysis on the efficacy of cytomegalovirus preventive strategies in solid organ transplant. *Clin Infect Dis.* 2014, 58(6):785-803.
127. - Owers DS, Webster AC, Strippoli GF, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 28(2): CD005133.
128. - Zhang LF, Wang YT, Tian JH, Yang KH, Wang JQ. Preemptive versus prophylactic protocol to prevent cytomegalovirus infection after renal transplantation: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Transpl Infect Dis.* 2011, 13(6): 622-32.
129. - Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *AJT* 2004; 4: 611-620.

130. - Emery VC. Human herpesvirus vaccines and future directions. *Am J Transplant.* 2013, 13 (3): 79-86.
131. - Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stobernack HP, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G; AIC246 Study Team. Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2014, 370(19): 1781-9.
132. - Stoelben S, Arns W, Renders L, Hummel J, Mühlfeld A, Stangl M, Fischereder M, Gwinner W, Suwelack B, Witzke O, Dürr M, Beelen DW, Michel D, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Budde K. Preemptive treatment of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a Phase 2a study. *Transpl Int.* 2014, 27(1): 77-86.
133. - Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis.* 2012, 55(12): 1678-89.
134. - Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, Hirsch HH. The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant.* 2016, 16(6): 1697-706.
135. - Pass RF, Zhang C, Evans A, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2009, 360: 1191–1199.
136. - Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, et al. Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: A phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011, 377: 1256–1263.

137. - Kharfan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, et al. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis* 2012, 12: 290–299.
138. - Bernstein DI, Reap EA, Katzen K, et al. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine* 2009, 28: 484–493.
139. - [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)
140. – Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007, 357: 2562 – 2575.
141. - Lamb KE1, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant*. 2011, 11(3): 450 - 62.
142. - Andrassy J, Hoffmann VS, Rentsch M, Stangl M, Habicht A, Meiser B, Fischereder M, Jauch KW, Guba M. Is cytomegalovirus prophylaxis dispensable in patients receiving an mTOR inhibitor-based immunosuppression? a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2012, 27; 94(12): 1208-17.
143. - Buchkovich NJ, Yu Y, Zampieri CA, Alwine JC. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat Rev Microbiol*. 2008, 6(4): 266-75.
144. - Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP, Ahmed R. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009, 2; 460(7251): 108-12.

145. - Havenith SH, Yong SL, van Donselaar-van der Pant KA, van Lier RA, ten Berge IJ, Bemelman FJ. Everolimus-treated renal transplant recipients have a more robust CMV-specific CD8+ T-cell response compared with cyclosporine- or mycophenolate-treated patients. *Transplantation*. 2013, 15; 95(1): 184-91.
146. - Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant*. 2009, 9(12): 2655-61.
147. - Nashan B, Gaston R, Emery V, Säemann MD, Mueller NJ, Couzi L et al. Review of cytomegalovirus infection findings with mammalian target of rapamycin inhibitor-based immunosuppressive therapy in de novo renal transplant recipients. *Transplantation*. 2012, 15; 93 (11): 1075 - 85.
148. - Kasiske BL, Zeier MG, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, Green MD et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009, 9 Suppl 3: S1 - 155.
149. - Vincenti, F. Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaite L, et al. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2016; 374: 333 – 343.
150. - Sis B, Mengel M, Haas M et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010, 10: 464 - 471.
151. - Zhou W, Longmate J, Lacey SF et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009, 113: 6465 - 6476.

152. – Oriol Manuel, Shahid Husain, Deepali Kumar, Carlos Zayas, Steve Mawhorter, Marilyn E. Levi et al. Assessment of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity for the Prediction of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid-Organ Transplant Recipients: A Multicenter Cohort Study. *CID* 2013, 56(6): 817 – 24.
153. - Lilleri D, Zelini P, Fornara C, Comolli G and Gerna G. Inconsistent responses of cytomegalovirus-sepecific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2007, 7: 1997 – 2005.
154. - Kim SH, Lee HJ, Kim SM, Jung JH, Shun S et al. Diagnostic usefulness of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity in predicting CMV infection after kidney transplantation: A pilot proof-of-concept study. *Infect Chemother* 2015, 47 (2): 105-110.
155. - Rittà M, Costa C, Sidoti F, Balloco C, Ranghino A et al. Pre-trasnplant assessment of CMV-specific immune response by ELISPOT assay in kidney transplant recipients. *New microbiologica* 2015, 38: 329-335.
156. - Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fiscon M, Silvestre C et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV Quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2013, 51 (8): 2501-2507.
157. – Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C et al. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 2006, 1; 107 (3): 1230 - 2.
158. - Chen C, Busson M, Rocha V, Appert ML, Lepage V, Dulphy N et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted

HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. Bone Marrow Transplant 2006, 38 (6): 437 - 44.

159. - Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K et al. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. Transplantation 2007, 15; 84 (11): 1527 - 33.

160. – Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. Blood 2004, 1; 104 (12): 3664 - 71.

161. - Lopez-Vergés S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA et al. Expansion of a unique CD57<sup>+</sup> NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci USA 2011, 6; 108 (36): 14725 - 32.

162. - Introna M, Allavena P, Spreafico F, Mantovani A. Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. Transplantation 1981, 31 (2): 113 - 6.

163. - Pores-Fernando AT, Gaur S, Doyon MY, Zweifach A. Calcineurin-dependent lytic granule exocytosis in NK-92 natural killer cells. Cell Immunol 2009, 254 (2): 105 - 9.

164. - Morteau O, Blundell S, Chakera A, Bennett S, Christou CM, Mason PD, Cornall RJ, O'Callaghan CA. Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. PLoS One 2010, 12; 5 (10): e13294.

165. - Ge S, Karasyov A, Sinha A, Petrosyan A, Lovato D, Thomas DL et al. Cytomegalovirus Immunity after Alemtuzumab Induction in Desensitized Kidney Transplant Patients. Transplantation 2016. DOI: 10.1097/TP.0000000000001573.

166. - Pascual J, Royuela A, Fernández AM, Herrero I, Delgado JF, Solé A et al. Role of mTOR inhibitors for the control of viral infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2016, DOI: 10.1111/tid.12601.
167. - Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Oliveira N, Sandes-Freitas T et al. Reduced incidence of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients receiving everolimus and reduced tacrolimus doses. *Am J Transplant* 2015, 15: 2655 – 2664.



## ANEXO



**Anexo 1: Artículo publicado en Nefrología**

**Infección por citomegalovirus post-trasplante renal y pérdida del injerto a largo plazo. Cytomegalovirus infection after kidney transplantation and long-term graft loss**



Manuscript Number: NEFRO-D-15-00308R2

Title: La infección por citomegalovirus post-trasplante renal y pérdida del injerto a largo plazo. Cytomegalovirus infection after kidney transplantation and long-term graft loss

Article Type: Original

Keywords: Infección por citomegalovirus; pérdida injerto; mortalidad; trasplante renal.  
Cytomegalovirus infection; graft loss; mortality; kidney transplant.

Corresponding Author: Ms. maria ovidia lopez-oliva, MD

Corresponding Author's Institution: Hospital universitario La Paz

First Author: maria ovidia lopez-oliva, MD

Order of Authors: maria ovidia lopez-oliva, MD; Julio Flores; Rosario Madero; Fernando Escuin; María José Santana; Teresa Bellón; Rafael Selgas; Carlos Jiménez

Abstract: Antecedentes: A pesar del uso de estrategias de prevención y la mejora en los métodos diagnósticos el citomegalovirus (CMV) continúa siendo la complicación viral más frecuente después del trasplante renal y su impacto en los resultados a largo plazo se sigue debatiendo.

Objetivo: Conocer la incidencia de infección/enfermedad por CMV bajo estrategias de prevención y analizar su asociación con la supervivencia del paciente y del injerto y con otros eventos clínicos relacionados con el CMV.

Métodos: Revisión de las historias clínicas de 377 pacientes trasplantados de riñón entre Enero 1998 y Diciembre 2008. Se analizó la supervivencia por el método de Kaplan-Meier en función de la presencia o ausencia de infección/enfermedad CMV y se usó el modelo de cox para identificar factores asociados con infección/enfermedad CMV y para evaluar su impacto en la mortalidad y pérdida del injerto.

Resultados: La incidencia de infección por CMV fue del 34,7% y de enfermedad del 9,5%. La supervivencia del paciente y del injerto fue significativamente inferior en los pacientes con infección/enfermedad CMV. La infección/enfermedad por CMV se asoció de forma significativa con mayor riesgo de pérdida del injerto (HR 1,91, 95% IC 1,09-3,36, p = 0,023) pero no con más riesgo de mortalidad (HR 1,29, 95% IC 0,7-2,38, p = 0,4).

Conclusión: La replicación viral después del trasplante es un factor de riesgo de pérdida del injerto pero no de mortalidad a largo plazo. Las estrategias de prevención disminuyen la incidencia de infección y enfermedad por CMV postrasplante.

Background: Despite use of prevention strategies, cytomegalovirus (CMV) infection represents the most common viral complication after renal transplantation and its impact on long-term outcome is still debated. Objective: Evaluate the incidence of CMV infection and disease during the use of prevention strategies in our center and analyze the association

between CMV infection and long-term patient and graft survival and other potentially clinical events related with CMV.

Methods: We reviewed the medical records of 377 kidney transplant recipients performed between January 1998 and December 2008. Kaplan-Meier survival curve analysis was performed to analyze graft and patient survival by CMV infection/disease and Cox proportional hazards regression was used to identify factors associated with CMV infection/disease, graft loss and mortality.

Results: The incidence of CMV infection was 34,7% and CMV disease was 9,5%. Patient and graft survival was significantly inferior in patients with CMV infection/disease. CMV infection/disease was associated with a higher risk of graft loss (HR 1.91, 95% CI 1.09-3.36,  $p = 0,023$ ), but not with a higher mortality (HR 1.29, 95% CI 0.7-2.38,  $p = 0,4$ ).

Conclusion: CMV replication after renal transplantation is a risk factor of long-term graft loss but not mortality. Prevention strategies decrease post-transplant CMV infection and disease.

Suggested Reviewers:

Opposed Reviewers:

Response to Reviewers: Agradecemos la aceptación del trabajo y la sugerencia de cambio de título aportada por los revisores.

COMENTARIOS PARA LOS AUTORES:

El trabajo es interesante y puede aceptarse. Sugerimos a los autores cambiar el título por este otro: "LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS POST-TRASPLANTE RENAL Y PÉRDIDA DEL INJERTO A LARGO PLAZO "

Se cambia el título de acuerdo a la sugerencia realizada

Reviewer #2: El trabajo ha mejorado ostensiblemente tras las modificaciones realizadas por los autores. La reducción de los métodos estadísticos y la síntesis de los resultados apoyándose más en las tablas, hace que el mensaje queda más claro y simplificado para los lectores. Los autores también han mejorado la descripción de la serie de pacientes y los resultados clínicos tal y como fue sugerido por los revisores.

**Título:** La infección por citomegalovirus post-trasplante renal y pérdida del injerto a largo plazo.

**Autores:** María Ovidia López-Oliva<sup>1</sup>, Julio Flores<sup>2</sup>, Rosario Madero<sup>3</sup>, Fernando Escuin<sup>1</sup>, María José Santana<sup>1</sup>, Teresa Bellón<sup>4</sup>, Rafael Selgas<sup>1</sup> and Carlos Jiménez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Rosales, El Salvador, San Salvador

<sup>3</sup> Sección de Bioestadística, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Instituto de Investigación sanitaria. Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

**Autor para correspondencia:**

María O. López-Oliva

Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz – IdiPaz

Paseo de la Castellana, 261, Madrid. España.

Email: [mlopezo@salud.madrid.org](mailto:mlopezo@salud.madrid.org)

Phone: + 34 91 207 1855

**Observaciones:**

MOLO, RS, TB y CJ han participado en el diseño del estudio. MOLO, JF y CJ han recogido los datos procedentes de las historias clínicas de los pacientes. RM ha realizado el análisis estadístico de los datos. MJS y FE han participado en el cuidado de los pacientes incluidos y MOLO y CJ son responsables de la escritura del manuscrito.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

No se ha recibido financiación para la realización de este estudio.

**Título:** La infección por citomegalovirus post-trasplante renal y pérdida del injerto a largo plazo

**Autores:** María Ovidia López-Oliva<sup>1</sup>, Julio Flores<sup>2</sup>, Rosario Madero<sup>3</sup>, Fernando Escuin<sup>1</sup>, María José Santana<sup>1</sup>, Teresa Bellón<sup>4</sup>, Rafael Selgas<sup>1</sup> and Carlos Jiménez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Rosales, El Salvador, San Salvador

<sup>3</sup> Sección de Bioestadística, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Instituto de Investigación sanitaria. Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

**Autor para correspondencia:**

María O. López-Oliva

Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz – IdiPaz

Paseo de la Castellana, 261, Madrid. España.

Email: [mlopezo@salud.madrid.org](mailto:mlopezo@salud.madrid.org). Teléfono: + 34 91 207 1855

**Resumen**

**Antecedentes:** A pesar del uso de estrategias de prevención y la mejora en los métodos diagnósticos el citomegalovirus (CMV) continúa siendo la complicación viral más frecuente después del trasplante renal y su impacto en los resultados a largo plazo se sigue debatiendo.

**Objetivo:** Conocer la incidencia de infección/enfermedad por CMV bajo estrategias de prevención y analizar su asociación con la supervivencia del paciente y del injerto y con otros eventos clínicos relacionados con el CMV.

**Métodos:** Revisión de las historias clínicas de 377 pacientes trasplantados de riñón entre Enero 1998 y Diciembre 2008. Se analizó la supervivencia por el método de Kaplan-Meier en función de la presencia o ausencia de infección/enfermedad CMV y se usó el modelo de cox para identificar factores asociados con infección/enfermedad CMV y para evaluar su impacto en la mortalidad y pérdida del injerto.

**Resultados:** La incidencia de infección por CMV fue del 34,7% y de enfermedad del 9,5%. La supervivencia del paciente y del injerto fue significativamente inferior en los pacientes con infección/enfermedad CMV. La infección/enfermedad por CMV se asoció de forma significativa con mayor riesgo de pérdida del injerto (HR 1,91, 95% IC 1,09-



3,36,  $p = 0,023$ ) pero no con más riesgo de mortalidad (HR 1,29, 95% IC 0,7-2,38,  $p = 0,4$ ).

**Conclusión:** La replicación viral después del trasplante es un factor de riesgo de pérdida del injerto pero no de mortalidad a largo plazo. Las estrategias de prevención disminuyen la incidencia de infección y enfermedad por CMV postrasplante.

**Palabras clave:** Infección por citomegalovirus, pérdida injerto, mortalidad, trasplante renal.

**Título corto:** CMV y supervivencia postrasplante renal

**Title:** Cytomegalovirus infection after kidney transplantation and long-term graft loss

#### **Abstract**

**Background:** Despite use of prevention strategies, cytomegalovirus (CMV) infection represents the most common viral complication after renal transplantation and its impact on long-term outcome is still debated.

**Objective:** Evaluate the incidence of CMV infection and disease during the use of prevention strategies in our center and analyze the association between CMV infection and long-term patient and graft survival and other potentially clinical events related with CMV.

**Methods:** We reviewed the medical records of 377 kidney transplant recipients performed between January 1998 and December 2008. Kaplan-Meier survival curve analysis was performed to analyze graft and patient survival by CMV infection/disease and Cox proportional hazards regression was used to identify factors associated with CMV infection/disease, graft loss and mortality.

**Results:** The incidence of CMV infection was 34,7% and CMV disease was 9,5%. Patient and graft survival was significantly inferior in patients with CMV infection/disease. CMV infection/disease was associated with a higher risk of graft loss (HR 1.91, 95% CI 1.09-3.36,  $p = 0,023$ ), but not with a higher mortality (HR 1.29, 95% CI 0.7-2.38,  $p = 0,4$ ).

**Conclusion:** CMV replication after renal transplantation is a risk factor of long-term graft loss but not mortality. Prevention strategies decrease post-transplant CMV infection and disease.

**Key words:** Cytomegalovirus infection, graft loss, mortality, kidney transplant.

## Introducción

La infección por citomegalovirus (CMV) continúa siendo una complicación frecuente en los pacientes que reciben un trasplante renal. Suele aparecer en el primer año postrasplante y cuando aparece tiene consecuencias directas e indirectas sobre el paciente y el injerto tanto a corto como a largo plazo<sup>1</sup>. Los efectos directos son bien conocidos, se relacionan con altas tasas de replicación viral y se presentan en forma de infección o enfermedad por CMV. Sin embargo los efectos indirectos son más difíciles de reconocer y se deben a la interacción de bajas tasas de replicación viral con el sistema inmune<sup>2</sup>.

En la era en la que las estrategias de prevención y monitorización viral no se usaban de forma generalizada la incidencia de infección y enfermedad por CMV eran elevadas (60% infección y 30% enfermedad)<sup>3</sup> y tanto la combinación serológica frente al CMV entre el donante y el receptor como el uso de anticuerpos anti-linfocitarios se comportaban como importantes factores de riesgo de enfermedad por CMV<sup>4</sup>. Esto sirvió para definir el riesgo de infección de los pacientes y clasificarlos en pacientes de alto, moderado o bajo riesgo de infección. Esta clasificación se sigue empleando actualmente para definir la estrategia de prevención<sup>5</sup>.

Los efectos indirectos se han asociado con un incremento de la morbilidad (infecciones oportunistas), pérdida del injerto y mortalidad a largo plazo<sup>6-13</sup>.

La aparición de fármacos antivirales eficaces en el control del CMV, como son el ganciclovir y el valganciclovir, la mejora de los métodos diagnósticos y el empleo de estrategias de prevención frente al CMV (profilaxis universal y terapia anticipada), han supuesto un hito importante en la mejora de los cuidados y de los resultados del trasplante, consiguiendo disminuir el riesgo de infección y enfermedad por CMV<sup>6,14</sup>, el riesgo de rechazo agudo y el riesgo de mortalidad y pérdida del injerto a largo plazo<sup>6,7,12,15-17</sup>.

Con este estudio nos proponemos conocer la incidencia acumulada de infección/enfermedad por CMV en nuestro medio, teniendo en cuenta las diferencias en las estrategias de prevención a lo largo del tiempo y analizar si existe asociación no sólo entre la replicación viral y la supervivencia del paciente y del injerto a largo plazo sino también con otros eventos adversos potencialmente relacionados con el CMV como son la enfermedad cardiovascular, las neoplasias y las infecciones.

## **Pacientes y métodos**

### **Diseño del estudio:**

Realizamos un estudio observacional, retrospectivo y unicéntrico, en el que la infección o enfermedad por CMV después del trasplante renal fue la variable principal de interés. Se crearon dos cohortes de pacientes basadas en la existencia o no de infección o enfermedad por CMV después del trasplante (grupo CMV y grupo no CMV, respectivamente). Se analizaron los resultados de forma global y según la estrategia de prevención utilizada (profilaxis universal o terapia anticipada).

### **Población de estudio**

Pacientes que recibieron un injerto renal en nuestro centro entre Enero de 1998 y Diciembre de 2008. Se excluyeron del análisis aquellos pacientes que perdieron el injerto renal, fallecieron o se perdió el seguimiento antes de los 3 meses postrasplante (en ninguno de estos casos el hecho fue secundario a enfermedad por CMV). La figura 1 muestra la distribución de los casos en relación con las estrategias de prevención y la replicación de CMV.

Se incluyeron 377 pacientes, de los cuales 344 (91,2 %) fueron primeros trasplantes y 33 (8,8 %) re-trasplantes. Doscientos cuarenta y cuatro (64,7 %) pacientes eran varones y 133 (35,3 %) mujeres. La edad media y desviación estándar de los receptores y los donantes en el momento del trasplante fue de  $48,6 \pm 13,4$  y  $46,9 \pm 14,3$  años respectivamente. El 93,9 % (N=354) de los pacientes recibieron un injerto renal de donante cadáver, el 5 % (N=19) de donante vivo relacionado y el 1,1 % (N=4) de donante en asistolia.

Los pacientes se siguieron hasta el fallecimiento, pérdida de seguimiento o finalización del estudio en Diciembre de 2013. A los pacientes que perdieron el injerto (vuelta permanente a diálisis), se les siguió durante el periodo de diálisis hasta su fallecimiento o hasta la finalización del estudio en Diciembre de 2013.

Los datos de los donantes y los receptores se recogieron de las historias clínicas del hospital. La selección de los donantes fue homogénea a lo largo de todo el periodo de estudio y no se realizó estudio histológico al injerto renal pre-trasplante.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital.

### **Inmunosupresión**

El 64,7 % (N=244) de los pacientes recibieron triple terapia con inducción y el 35,3 % (N=133) sólo triple terapia sin inducción.

Para la inducción se utilizaron anticuerpos monoclonales en 232 pacientes (95,1%) (ILR2: 181, OKT3: 51) y anticuerpos policlonales en 12 pacientes (4,9%) (timoglobulina: 8 y ATEGE: 4).

La triple terapia incluyó un inhibidor de calcineurina (ciclosporina (CyA) en 98 pacientes o tacrolimus (Tac) en 277), prednisona (N=377) y micofenolato mofetilo (MMF, N=358) o rapamicina (N=17). 2 pacientes recibieron rapamicina en lugar de inhibidor de calcineurina y 2 pacientes recibieron azatioprina en lugar de micofenolato mofetilo.

#### **Infección/enfermedad por CMV: estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento**

##### **Estrategias de prevención:**

**A). Profilaxis Universal (PU):** Se utilizó en receptores seronegativos y en receptores seropositivos que recibieron tratamiento de inducción con OKT3 o con anticuerpos policlonales. Antes de Octubre de 2003 la profilaxis antiviral se realizó con ganciclovir (N=78 pacientes) y a partir de Octubre de 2003 con valganciclovir (N=43 pacientes). La duración de la profilaxis fue de 3 meses (media  $\pm$  DS: 3,0  $\pm$  0,84 meses).

**B). Terapia anticipada (TA):** Se utilizó en receptores seropositivos que no recibieron tratamiento de inducción con anticuerpos policlonales ni OKT3. En estos pacientes se realizaba monitorización virológica mediante antigenemia pp65 de forma semanal en el primer mes, quincenal el 2º y 3º mes y mensual del 4º al 12º mes. Cuando se detectaba replicación viral se iniciaba tratamiento con ganciclovir (hasta Octubre 2003, N=128) o valganciclovir (a partir de Octubre 2003, N=128).

**Diagnóstico:** El seguimiento virológico y el diagnóstico se realizaron mediante la evaluación de la antigenemia pp65. Se consideró que había replicación por CMV cuando la antigenemia pp65 era  $> 5$  células positivas /  $2 \times 10^5$  polimorfonucleares. Los pacientes con infección por CMV presentaban antigenemia pp65 positiva sin síntomas y los pacientes con enfermedad por CMV presentaban síntomas (síndrome viral o enfermedad invasiva) además de la antigenemia positiva.

**Tratamiento:** Para los casos de infección por CMV se empleó en la mayor parte de los casos tratamiento antiviral con ganciclovir (antes de Octubre de 2003) o valganciclovir (a partir de Octubre de 2003) ajustado a función renal. En algunos casos además del tratamiento antiviral se redujo la dosis de MMF y en otros sólo se redujo la dosis de MMF sin utilizar fármaco antiviral.



Los casos severos de enfermedad por CMV se trataron con ganciclovir iv (5 mg/kg cada 12 horas, 2-3 semanas), disminución de la dosis de MMF y continuación con ganciclovir o valganciclovir oral 2-3 semanas más.

El antiviral se suspendía habitualmente después de 2 controles de antigenemia pp65 negativos consecutivos.

**Definición de otras variables:**

**Retraso en la función inicial del injerto:** Definida como la necesidad de diálisis en la primera semana postrasplante.

**Complicaciones quirúrgicas en los primeros 6 meses postrasplante:** Definida como hemorragia que requiere re-intervención, trombosis vascular, fistula urinaria o linfocele que requiere intervención quirúrgica, obstrucción de la vía urinaria por estenosis distal del uréter y otras.

**Rechazo Agudo:** Se consideraron para el análisis los rechazos diagnosticados por biopsia que aparecieron en cualquier momento después del trasplante.

**Eventos clínicos postrasplante:** Se recogieron los siguientes eventos clínicos: infecciones bacterianas que requirieron ingreso hospitalario después del trasplante, existencia de neoplasia postrasplante, diabetes mellitus postrasplante (definida por la toma de antidiabéticos orales o insulina) y enfermedad cardiovascular postrasplante: cardiopatía isquémica (infarto agudo de miocardio o angor inestable), enfermedad isquémica cerebral (accidente cerebrovascular o isquémico transitorio) o enfermedad arterial periférica (amputación de algún miembro o colocación de stent arterial).

**Análisis estadístico**

La descripción de las variables cuantitativas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar o como mediana y rango intercuartílico (RIC). Se empleó el test chi cuadrado para estudiar la asociación entre variables cualitativas y el test t-Student para comparar medias de variables cuantitativas.

**1.- Análisis de supervivencia:**

Se realizó un análisis de supervivencia del paciente y del injerto por el método de Kaplan-Meier. Se compararon las curvas de supervivencia con la prueba del log-rank. En el análisis de supervivencia del paciente se consideró evento a la muerte del paciente por cualquier causa y se consideraron censuras los casos de pérdidas de seguimiento y los casos en los que no ocurrió el evento al finalizar el estudio (31 Diciembre 2013). Los pacientes que perdieron el injerto fueron seguidos hasta su muerte o finalización del estudio.

En el análisis de supervivencia del injerto se consideró evento a la pérdida del injerto por cualquier causa, definida como la vuelta definitiva a diálisis y se consideraron censuras los casos de pérdidas de seguimiento, los casos en los que no ocurrió el evento al finalizar el estudio (31 Diciembre 2013) y la muerte con injerto funcionando.

Para estudiar posibles factores asociados al riesgo de infección/enfermedad por CMV, mortalidad y pérdida del injerto se realizó un estudio univariable y multivariable con modelos de regresión de riesgos proporcionales o modelo de Cox. Aquellas variables con efectos clínicos y un valor de  $p < 0,2$  en el análisis univariable se incluyeron en el modelo multivariable. Se consideró significativo cuando la  $p < 0,05$ . Estos análisis se realizaron por duplicado, por un lado considerando la infección y enfermedad CMV como variable agregada (modelo 1) y por otro teniendo en cuenta de manera separada la infección de la enfermedad CMV (modelo 2).

## Resultados

### Infección / enfermedad por CMV

Se incluyeron 377 pacientes (figura 1). El tiempo mediano de seguimiento fue de 8 años (RIC 3.7 meses – 15,9 años).

La incidencia acumulada, en el primer año, de infección por CMV fue del 34,7% (N=131) y de enfermedad del 9,5% (N=36) (síndromes virales). El resto de pacientes (55,7%, N=210) no tuvieron replicación CMV post-trasplante.

En la tabla 1 se muestran las características demográficas basales de los receptores y donantes en base a la presencia de infección/enfermedad por CMV.

En la tabla 2 se muestra la incidencia acumulada de infección y enfermedad por CMV y la incidencia de no replicación viral teniendo en cuenta la estrategia de prevención utilizada así como el fármaco antiviral. La infección por CMV (N=131) se presentó de media a los  $2,4 \pm 1,9$  meses después del trasplante (RIC 0.5-12 meses) y la enfermedad (N=36) a los 2 meses (RIC 1-36 meses) después del trasplante.

Los factores predictores de infección/enfermedad por CMV se muestran en la tabla 3.

### Eventos Clínicos postrasplante

Los pacientes con infección/enfermedad por CMV presentaron una mayor tendencia a desarrollar enfermedad cardiovascular postrasplante (grupo CMV: N=33 (19,8%) vs grupo No CMV N=24 (11,6%),  $p=0,06$ ) y diabetes mellitus postrasplante (grupo CMV: N=47 (28,3%) vs grupo No CMV: N=41 (19,8%),  $p=0,05$ ), sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con infecciones bacterianas y neoplasias post-trasplante.

Un 21% (N=35) de los pacientes con infección/enfermedad por CMV presentaron rechazo agudo por biopsia renal vs el 15,7% (N=33) de los pacientes sin infección/enfermedad por CMV ( $p=0,18$ ).

### Supervivencia del paciente y predictores de mortalidad global

Sesenta pacientes (15,9%) fallecieron a lo largo del periodo de seguimiento (44 pacientes murieron con injerto funcionando y 16 pacientes tras la pérdida del injerto, estando en diálisis).

Treinta y tres pacientes (8,7%) tuvieron infección por CMV y veintisiete (7,2%) no tuvieron replicación viral. Las causas de muerte fueron similares en los dos grupos: de causa cardiovascular fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 7 en el grupo no CMV, de causa infecciosa fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 2 en el grupo no CMV y

de causa neoplásica fallecieron 6 pacientes en el grupo CMV y 9 en el grupo no CMV. Por otras causas fallecieron 5 en el grupo CMV y 3 en el grupo no CMV.

En la figura 2A se muestra la supervivencia del paciente a largo plazo, ésta fue significativamente mejor en los pacientes que no tuvieron infección/enfermedad por CMV (grupo CMV: 64,2% vs grupo no CMV: 76,9% a los 15,8 años,  $p=0,019$ ). Cuando se tiene en cuenta la estrategia de prevención, la supervivencia fue significativamente inferior sólo en los pacientes que recibieron profilaxis universal y que presentaron infección/enfermedad por CMV (57,2% grupo CMV + profilaxis universal vs 81% grupo no CMV + profilaxis universal a los 14 años,  $p=0,03$ ) (figura 2B), mientras que los pacientes que recibieron terapia anticipada no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del paciente tuvieran o no infección/enfermedad por CMV (67,7% grupo CMV + terapia anticipada vs 72,6% grupo no CMV + terapia anticipada a los 15,3 años,  $p=0,178$ ).

El estudio de posibles factores asociados al riesgo de mortalidad se muestra en la tabla 4.

#### **Supervivencia del injerto y predictores de pérdida del injerto**

Los pacientes con infección/enfermedad por CMV perdieron el injerto renal con mayor frecuencia que los pacientes que no presentaron CMV: 30 (18%) vs 26 (12,4%), respectivamente. Las causas de pérdida del injerto fueron similares en los dos grupos: En el grupo CMV se perdió el injerto por rechazo agudo en 4 casos, rechazo crónico en 21 casos, recidiva de enfermedad de base en 1 caso y otras causas en 4 casos. En el grupo no CMV las causas fueron: rechazo agudo en 2 casos, rechazo crónico en 18 casos, recidiva de enfermedad de base en 2 casos y por otras causas en 4 casos.

En la figura 3A se muestra la supervivencia del injerto a largo plazo, que fue significativamente mejor en los pacientes sin infección/enfermedad por CMV (grupo CMV: 68% vs grupo no CMV: 74,1% a los 15,8 años,  $p=0,034$ ). Cuando se analizó la supervivencia teniendo en cuenta la estrategia de prevención utilizada (figura 3B) vimos que de nuevo la supervivencia del injerto fue significativamente inferior sólo en los pacientes con infección/enfermedad por CMV que recibieron profilaxis universal (36,6% grupo CMV + terapia profilaxis universal vs 77,2% grupo CMV no + profilaxis universal a los 14,3 años,  $p=0,001$ ), no habiendo diferencias estadísticamente significativa en la supervivencia del injerto entre los pacientes con o sin infección/enfermedad por CMV que recibieron terapia anticipada (82,6% grupo CMV + terapia anticipada vs 55,2% grupo CMV no + terapia anticipada,  $p=0,84$ ).



El estudio de posibles factores asociados al riesgo de pérdida del injerto se muestra en la tabla 5.

### Discusión

La incidencia acumulada, en el primer año postrasplante, de infección por CMV fue del 34,7% y de enfermedad del 9,5%. Nuestros datos son concordantes con lo descrito previamente por otros grupos que utilizan estrategias de prevención<sup>6,14</sup> y reflejan un importante descenso de la incidencia de infección y enfermedad por CMV tras el uso de las mismas. Sin embargo existen diferencias entre las estrategias de prevención, demostrado en nuestro trabajo y por otros autores<sup>21-24</sup>. Los pacientes de alto riesgo, que recibieron profilaxis universal, tuvieron más enfermedad por CMV que los pacientes con terapia anticipada, favorecido por la ausencia de inmunidad celular específica frente al CMV que los proteja adecuadamente frente a la reactivación viral. Por el contrario los pacientes con terapia anticipada presentaron tasas de infección por CMV superiores a los pacientes con profilaxis universal, hecho que es inherente a la propia estrategia.

El cambio de ganciclovir por valganciclovir disminuyó la incidencia de enfermedad, lo que pone de manifiesto la eficacia del valganciclovir en la prevención de la enfermedad por CMV. Este comportamiento ya fue comunicado por Paya et al<sup>25</sup> y es atribuible al mayor grado de exposición a ganciclovir alcanzado con valganciclovir (aproximadamente 1,7 veces mayor). Sin embargo, el efecto del fármaco empleado en cada periodo de tiempo no influyó de forma diferente en la supervivencia global del paciente ni en la del injerto tras realización de análisis de cox estratificado por periodo de tiempo (datos no mostrados).

El principal resultado de nuestro estudio es la asociación significativa entre la presencia de infección/enfermedad por CMV en los primeros meses después del trasplante y la pérdida del injerto a largo plazo, siendo la mediana de seguimiento de 8 años.

El análisis multivariable demostró que los pacientes con infección CMV presentaron 1,7 veces más riesgo de perder el injerto que los pacientes sin infección por CMV y que los pacientes con enfermedad por CMV presentaron 2,6 veces más riesgo de perder el injerto que aquellos que no presentaron enfermedad por CMV. Otros autores también demostraron este efecto negativo de la replicación viral en la supervivencia del injerto<sup>17</sup>.

26-29

Pero este mayor riesgo de pérdida del injerto es matizable en función de la estrategia de prevención empleada, de forma que el mayor riesgo de pérdida del injerto está asociado a la replicación viral postrasplante cuando habiendo recibido profilaxis universal, ésta

no es efectiva y se produce la infección o enfermedad CMV. Esto demuestra que el efecto deletéreo del CMV a largo plazo sobre el injerto alcanza su máxima expresión en los pacientes considerados como de alto riesgo.

Hay otros trabajos, incluyendo metanálisis que no encontraron asociación entre la replicación de CMV y la supervivencia del injerto<sup>18-20,24</sup>, posiblemente porque el tiempo de seguimiento de dichos estudios fue muy inferior al nuestro y cuando se trata de evaluar el éxito del trasplante la importancia del largo plazo es incuestionable.

La infección/enfermedad por CMV disminuye la supervivencia del paciente, sin embargo no mostró asociación con la mortalidad a largo plazo, hecho similar a lo descrito en otros trabajos<sup>20,30,31</sup>. Desde hace años hay evidencias de una posible asociación entre el CMV y la enfermedad cardiovascular<sup>32,33</sup>. En nuestro estudio cuando analizamos la asociación entre el CMV y los eventos cardiovasculares no encontramos diferencias estadísticamente significativas aunque sí se vio que había una mayor tendencia a sufrir un evento cardiovascular postrasplante entre los pacientes con infección/enfermedad por CMV.

La activación del CMV postrasplante produce un daño en el injerto y en el paciente que se asocia con mayor riesgo de pérdida del injerto a largo plazo, por lo que los intentos por mejorar su prevención ayudarían a progresar en los resultados a largo plazo. El primer hito en el control y manejo de esta complicación fue la aparición de fármacos antivirales potentes y el uso de estrategias de prevención. A día de hoy son las piedras angulares de la prevención del CMV y deben mantenerse, sin embargo no son suficientes para evitar la replicación viral. Durante las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto que la inmunidad innata y la específica frente al CMV desempeñan un papel crucial en el control del CMV y su monitorización está demostrando ser un avance importante en la capacidad de predecir qué pacientes tienen más riesgo de desarrollar infección/enfermedad por CMV postrasplante<sup>34-36</sup>, por tanto la monitorización inmunológica antes del trasplante en los pacientes de moderado riesgo y antes de finalizar la profilaxis en los pacientes de alto riesgo podría ser de utilidad en el control del CMV postrasplante.

Así mismo, con los datos que se derivan de este y otros estudios habría que considerar a los pacientes que tienen infección o enfermedad por CMV como pacientes con mayor riesgo de pérdida del injerto y mortalidad, por lo que deberían ser seguidos de forma cercana desde el punto de vista clínico en general y de la función renal, extremando las alertas sobre adherencia al tratamiento inmunosupresor y realizando una monitorización

clínica cardiovascular más estrecha. Esto podría ayudar a mejorar la supervivencia a largo plazo.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones, por un lado su naturaleza unicéntrica, que aunque puede favorecer la uniformidad de las acciones, limita la extrapolación de resultados. Esto no reduce la validez de los mismos, pero su interpretación requiere considerar las condiciones y circunstancias locales. Y por otro lado su condición retrospectiva que sólo nos permite especular sobre potenciales razones que expliquen las diferencias observadas entre los dos grupos. Sin embargo el estudio tiene el valor del largo periodo de seguimiento (mediana de 8 años de seguimiento), fundamental cuando se analiza el éxito del trasplante y la homogeneidad del equipo médico que se encargaba del cuidado de los pacientes.

En resumen, nuestro estudio demuestra que la replicación viral tras el trasplante disminuye la supervivencia del injerto y del paciente, comportándose como un factor de riesgo de pérdida del injerto pero no de mortalidad a largo plazo. Una monitorización clínica más estrecha a los pacientes con infección o enfermedad por CMV ayudaría a disminuir el daño provocado por el virus sobre el injerto y el paciente a largo plazo. Y confirma en población española que las estrategias de prevención frente al CMV disminuyen la incidencia de infección y enfermedad por CMV postrasplante, aunque sigue existiendo un porcentaje de replicación viral no despreciable que debemos mejorar y perseguir. La monitorización inmunológica es una herramienta útil que puede ayudar en el control del CMV postrasplante, aunque se necesitan estudios prospectivos que lo confirmen.

## Referencias

1. Fishman J.A. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *NEJM* 2007; 357: 2601-14.
2. Castón Osorio J.J, Zurbano Goñi F. Efectos indirectos de la infección por citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 (Supl 6): 6-10.
3. Sagedal S, Nordal K.P, Hartmann A, Sund S, Scott H et al. The Impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *AJT* 2002; 2: 850-56.
4. Schnitzler M.A, Lowell J.A, Hardinger K.L, Boxerman S.B, Brennan D.C. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *AJT* 2003; 3: 445-51.
5. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *AJT* 2013; 13: 93-106.
6. Hodson E. M, Jones C.A, Webster A.C, Strippoli G, Barclay P et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2005; 365: 2105-15.
7. Hartmann A, Sagedal S, Hjelmestaeth. The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: S15-S17.
8. Hjelmestaeth J, Sagedal S, Hartmann A, Rollag H, Egeland T, et al. Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk of new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia* 2004; 47: 1550
9. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004; 66: 329
10. Sagedal S, Rollag H, Hartmann A. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients is associated with impaired survival irrespective of expected mortality risk. *Clin Transplant* 2007; 21: 309-13.
11. Smedbraten YV, Sagedal S, Leivestad T, Mjoen G, Osnes K et al. The impact of early



cytomegalovirus infection after kidney transplantation on long-term graft and patient survival. *Clin Transplant* 2014; 28: 120-26.

12. Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J and Freifeld A. Meta-Analysis: The Efficacy of Strategies To Prevent Organ Disease by Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients. *Ann Intern Med* 2005; 143: 870-80.

13. Schneeberger H, Aydemir S, Müller R, Illner WD, Pfeiffer M et al. Hyperimmunoglobulin prophylaxis, monitoring and preemptive ganciclovir treatment eliminate the risk of CMV infection to improve patient and renal allograft survival. *Transpl Int* 2000; 13: S354-S358.

14. Guirado L, Rabella N, Díaz JM, Facundo C, Maderuelo A et al. Tratamiento profiláctico por cytomegalovirus en pacientes trasplantados renales mediante valganciclovir oral. *Nefrología* 2008; 28 (3) 293-300.

15. Opeltz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. *Transplantation* 2015; 99: 1197-1202.

16. Arthurs SK, Eid AJ, Pederson RA, Kremers WK, Cosio FG et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 840-6.

17. Nett PC, Heisey DM, Fernández LA, Sollinger H and Pirsch JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1036-1041.

18. Dickenmann MJ, Cathomas G, Steiger J, Mihatsch MJ, Thiel G et al. Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 764-767.

19. Eriksson BM, Wirgart BZ, Claesson K, Tufveson G, Magnusson G et al. A prospective study of rapid methods of detecting cytomegalovirus in the blood of renal transplant recipients in relation to patient and graft survival. *Clin Transplant* 1996; 10: 494 – 502.

20. San Juan R, de Dios B, García-Reyne A, Fernández-Ruiz M, Lumbreras C et al: Limited

impact of cytomegalovirus in the long-term outcome of renal and liver transplant. *J Clin Virol* 2013 56 (4): 316 - 22.

21. Manuel O, Kralidis G, Mueller NJ, Hirsch HH, Garzoni C et al. Impact of antiviral preventive strategies on the incidence and outcomes of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *AJT* 2013; 13: 2402-2410.

22. Harvala H, Stewart C, Muller K, Burns S, Marson L et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013; 85: 893-898.

23. Florescu DF, Qiu F, Schmidt M, Kalil AC. A direct and indirect comparison meta-analysis on the efficacy of cytomegalovirus preventive strategies in solid organ transplant. *Clin Infect Dis* 2014; 58 (6): 785-803.

24. Zhang. LF, Wang YT, Tian JH, Yang KH, Wang JQ. Preemptive versus prophylactic protocol to prevent cytomegalovirus infection after renal transplantation: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 622-632.

25. Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. Oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *AJT* 2004; 4: 611-620.

26. Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE et al. Association between cytomegalovirus disease and chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1879-1883.

27. Giral M, Nguyen JM, Daguin P, Hourmant M, Cantarovich D et al. Mycophenolate mofetil does not modify the incidence of cytomegalovirus (CMV) disease after kidney transplantation but prevents CMV-induced chronic graft dysfunction. *JASN*, 2001; 12: 1758-1763.

28. Schnitzler MA, Lowell JA, Hmiel SP, Hardinger KL, Liapis H et al. Cytomegalovirus disease after prophylaxis with oral ganciclovir in renal transplantation: The importance of HLA-DR matching. *JASN* 2003; 14: 780-785.
29. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J et al. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: Results of a randomized clinical trial. *AJT* 2008; 8: 975-983.
30. Humar A, Limaye AP, Blumberg EA, Hauser IA, Vincenti F et al. Extended valganciclovir prophylaxis in D+/R- kidney transplant recipients is associated with long-term reduction in cytomegalovirus disease: Two-year results of the IMPACT study. *Transplantation* 2010; 90: 1427-1431.
31. Owers DS, Webster AC, Strippoli GFM, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients (review). *Cochrane database Syst Rev* 2013; Issue 2.
32. Valantine HA, Gao SZ, Menon SG, Renlund DG, Hunt SA et al. Impact of prophylactic immediate posttransplant ganciclovir on development of transplant atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100: 61-66.
33. Courivaud C, Bamoulid J, Chalopin JM, Gaiffe E, Tiberghien P et al. Cytomegalovirus exposure and cardiovascular disease in kidney transplant patients. *J Infect Dis* 2013; 207: 1569-75.
34. Cantisán S, Lara R, Montejó M, Redel J, Rodríguez-Benot A et al. Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8 T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 738-745.
35. Bestard O, Lucia M, Crespo E et al. Pre-transplant immediately early-1-specific T cell responses provide protection for CMV infection after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 1793-1805.

36. López-Oliva M.O, Martinez V, Buitrago A, Jiménez C, Rivas B et al. Pre-transplant CD8-T cell response to IE-1 discriminates seropositive kidney recipients at risk of developing CMV infection posttransplant. *Transplantation* 2014; 97: 839-845



Tabla 1: Características demográficas de receptores, donantes y datos del trasplante según replicación CMV postrasplante

<b>Receptores</b>	<b>CMV (N=167)</b>	<b>No CMV (N=210)</b>	<b>p</b>
Edad - años (x±ds)	50.5 ± 13.2	47 ± 13.2	<b>0.006</b>
Sexo varón - n (%)	107 (64.1)	137 (65.2)	NS
Etiología ERC - n (%)			
Diabetes Mellitus	11 (6.8)	8 (3.8)	NS
No-diabetes mellitus	156 (93.2)	201 (96.2)	
Tipo de diálisis preTx - n (%)			
HD	97 (58.1)	112 (53.3)	NS
DP	68 (40.7)	90 (42.9)	
No-diálisis pre Tx	2 (1.2)	8 (3.8)	
IMC (Kg/m2) - n (%)			
Tiempo en diálisis - meses (x±ds)	31 ± 30.4	36 ± 52.6	NS
HTA preTx - n (%)	121 (73.8)	154 (77.8)	NS
DM preTx - n (%)	17 (10.2)	14 (7.1)	NS
Dislipemia preTx - n (%)	59 (37.3)	73 (38)	NS
<b>Donantes</b>	<b>CMV (N=167)</b>	<b>No CMV (N=210)</b>	<b>p</b>
Edad años (x±ds)	49.4 ± 13.3	45 ± 14.7	<b>0.003</b>
Sexo varón - n (%)	100 (60.2)	131 (63.9)	NS
<b>Datos trasplante</b>	<b>CMV (N=167)</b>	<b>No CMV (N=210)</b>	<b>p</b>
Incompatibilidades HLA DR - n (%)			NS
0//1/2 incompatibilidades	48 (28.9) / 88 (53) / 30 (18)	58 (28.3) / 116 (56.6) / 31 (15.1)	
Tiempo isquemia fría (h) (x±ds)	15.3 ± 6.3	15 ± 6.6	NS
Tiempo isquemia templada (min) (x±ds)	52.5 ± 18.7	52.4 ± 16.3	NS
IS de inducción - n (%)			NS
Anticuerpos monoclonales (Anti-CD25)	80 (47.9)	101 (48.1)	
Anticuerpos policlonales (OKT3, timoglobulina, ATEGE)	22 (13.2)	41 (19.6)	
No-inducción	65 (38.9)	68 (32.4)	
IS de mantenimiento - n (%)			NS
Tacrolimus	114 (68.3)	163 (77.6)	
Ciclosporina A	51 (30.5)	47 (22.4)	
Rapamicina	2 (1.2)	-	
RFI - n (%)	32 (20.8)	27 (12.9)	NS
Rechazo agudo (por biopsia) - n (%)	35 (21)	33 (15.7)	NS
Complicaciones quirúrgicas - n (%)	33 (19.9)	35 (16.7)	NS

Tabla 2: Tabla 2: Incidencia acumulada, en el primer año, de infección y enfermedad CMV.

	Profilaxis con ganciclovir (N=78)	Profilaxis con valganciclovir (N=43)	Terapia anticipada con ganciclovir (N=128)	Terapia anticipada con valganciclovir (N=128)
Infección CMV – n (%)	23 (29,5%)	14 (32,5%)	44 (34,4%)	54 (42,2%)
Enfermedad CMV – n (%)	12 (15,4%)	3 (7%)	14 (10,9%)	7 (5,5%)
No replicación viral – n (%)	43 (55,1%)	26 (60,5%)	70 (54,7%)	67 (52,3%)

Tabla 3: Tabla 3: Análisis de factores de riesgo de infección/enfermedad por CMV.

Variable	Análisis univariante			Análisis multivariante		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Edad receptor, por año	1.01	1.006-1.03	0.003	1.02	1.008-1.03	0.002
CMV D+/R-	2.27	1.19-4.32	0.012	2.46	1.28-4.73	0.007
CMV D+/R+	2.04	1.17-3.55	0.011	1.89	1.08-3.29	0.024
Diabetes Mellitus	1.31	0.78-2.21	0.29			
IMC receptor (kg/m <sup>2</sup> )	1.01	0.97-1.05	0.46			
Tipo donante (vivo vs cadáver)	0.75	0.35-1.61	0.46			
Tratamiento IS (Tacro vs CyA)	0.64	0.46-0.89	0.009	1.51	1.08-2.09	0.014
Tiempo en diálisis pre-Tx (meses)	0.99	0.99-1.002	0.34			
Rechazo agudo (por biopsia)	11.34	0.95-1.90	0.092			

Tabla 4: Tabla 4: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo.

Modelo 1	Análisis univariante			Análisis multivariante		
Variable	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Infección + enfermedad por CMV	1.74	1.04-2.89	0.033	1.29	0.70-2.38	0.4
Edad receptor, por año	1.07	1.05-1.1	<0.001	1.09	1.05-1.13	<0.001
Diabetes Mellitus	3.99	2.09-7.58	<0.001	1.38	0.53-3.58	0.5
IMC receptor	1.14	1.07-1.21	<0.001	1.08	1.01-1.17	0.02
Edad donante, por año	1.026	1.006-1.04	0.009	0.98	0.96-1.01	0.30
Tiempo de isquemia fría	1.04	1.001-1.08	0.045	1.07	1.02-1.11	0.002
Función inicial del injerto	0.58	0.34-0.97	0.038	1.03	0.5-2.1	0.93
Enfermedad cardiovascular	1.69	0.95-3.01	0.07	0.93	0.46-1.89	0.84
Pérdida del injerto	2.85	1.6-5.07	<0.001	2.78	1.3-5.92	0.008

Modelo 2	Análisis univariante			Análisis multivariante		
Variable	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Enfermedad CMV	2.53	1.25-5.11	0.009	1.26	0.52-3.04	0.598
Infección CMV	1.60	0.91-2.82	0.10	1.26	0.64-2.49	0.49
Edad receptor, por año	1.07	1.05-1.1	<0.001	1.09	1.05-1.13	<0.001
Diabetes Mellitus	3.99	2.09-7.58	<0.001			
IMC receptor	1.14	1.07-1.21	<0.001	1.08	1.008-1.17	0.03
Edad donante, por año	1.026	1.006-1.04	0.009			
Tiempo de isquemia fría	1.04	1.001-1.08	0.045	1.01	0.95-1.07	1.01
Función inicial del injerto	0.58	0.34-0.97	0.038	1.05	0.52-2.15	0.87
Enfermedad cardiovascular	1.69	0.95-3.01	0.07	1.08	0.52-2.22	0.83
Pérdida del injerto	2.85	1.6-5.07	0.001	3.00	1.42-6.35	0.004

Tabla 5: Tabla 5: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo.

Modelo 1	Análisis univariante			Análisis multivariante		
Variable	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Infección + enfermedad CMV	1,8	1.06-3.06	0.029	1.92	1.03-3.36	0.023
Edad receptor, por año	0.96	0.94-0.98	0.002	0.95	0.93-0.98	0.001
Diabetes Mellitus	1.68	0.66-4.27	0.27			
IMC receptor	1.03	0.96-1.11	0.36			
Edad donante, por año	1.01	0.99-1.03	0.1			
Tiempo de isquemia fría	1.04	1.005-1.09	0.028	1.05	1.001-1.09	0.046
Retraso en la función inicial del injerto	2.03	1.2-3.44	0.008	1.54	0.83-2.84	0.16
Rechazo agudo (por biopsia)	1.8	1.03-3.13	0.038	2.44	1.33-4.47	0.004
Profilaxis Universal	2.8	1.64-4.76	<0.001	1.85	1.03-3.34	0.039
Complicaciones quirúrgicas	1.8	1.06-3.06	0.029	2.17	1.21-3.91	0.01

Modelo 2	Análisis univariante			Análisis multivariante		
Variable	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Enfermedad por CMV	2.70	1.33-5.48	0.006	2.60	1.21-5.85	0.014
Infección por CMV	1.46	0.80-2.65	0.21	1.73	0.91-3.29	0.094
Edad receptor, por año	0.96	0.94-0.98	0.002	0.96	0.93-0.98	0.001
Tiempo de isquemia fría	1.04	1.005-1.09	0.028	1.05	1.012-1.10	0.012
Rechazo agudo (por biopsia)	1.8	1.03-3.13	0.038	2.57	1.38-4.77	0.003
Profilaxis Universal	2.8	1.64-4.76	<0.001	1.77	0.98-3.20	0.057
Complicaciones quirúrgicas	1.8	1.06-3.06	0.029	2.17	1.19-3.94	0.011

Título y notas al pie de tablas y figuras

Figura 1: Diagrama de flujo del estudio

Leyenda figura 1: Pacientes incluidos en el estudio según la estrategia de prevención.

Figura 2: Supervivencia del paciente según la presencia o ausencia de infección/enfermedad CMV.

Leyenda figura 2: La supervivencia del paciente en la cohorte global del estudio fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV (fig 2a) al igual que en aquellos que recibieron profilaxis universal (fig 2b). Los pacientes con terapia anticipada presentaron una supervivencia del paciente similar en ambos grupos (fig 2c).

Figura 3: Supervivencia del injerto según la presencia o ausencia de infección/enfermedad CMV.

Leyenda figura 3: La supervivencia del injerto en la cohorte global de estudio fue superior en los pacientes que no presentaron infección/enfermedad por CMV (fig 3a) al igual que en aquellos que recibieron profilaxis universal (fig 3b). Los pacientes con terapia anticipada presentaron una supervivencia del injerto similar en ambos grupos (fig 3c).

Tabla 1: Características demográficas de receptores, donantes y datos del trasplante según replicación CMV postrasplante.

Leyenda tabla 1: ds: desviación estándar, ERC: enfermedad renal crónica, Tx: trasplante, HD: hemodiálisis, DP: diálisis peritoneal, IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus, IS: inmunosupresión, RFI: retraso en la función inicial del injerto (necesidad de diálisis en la primera semana)

Tabla 2: Incidencia acumulada, en el primer año, de infección y enfermedad CMV.

Tabla 3: Análisis de factores de riesgo de infección/enfermedad por CMV.

Tabla 4: Análisis de factores de riesgo de mortalidad a largo plazo.

Tabla 5: Análisis de factores de riesgo de pérdida del injerto a largo plazo.

Figura 1 diagrama de flujo del estudio.  
 Receptores de trasplante renal en nuestro centro  
 entre Enero 1998 y Diciembre 2008 (n = 408)  
[Click here to download Figura: Figura 1 Diagrama de flujo del estudio.pdf](#)

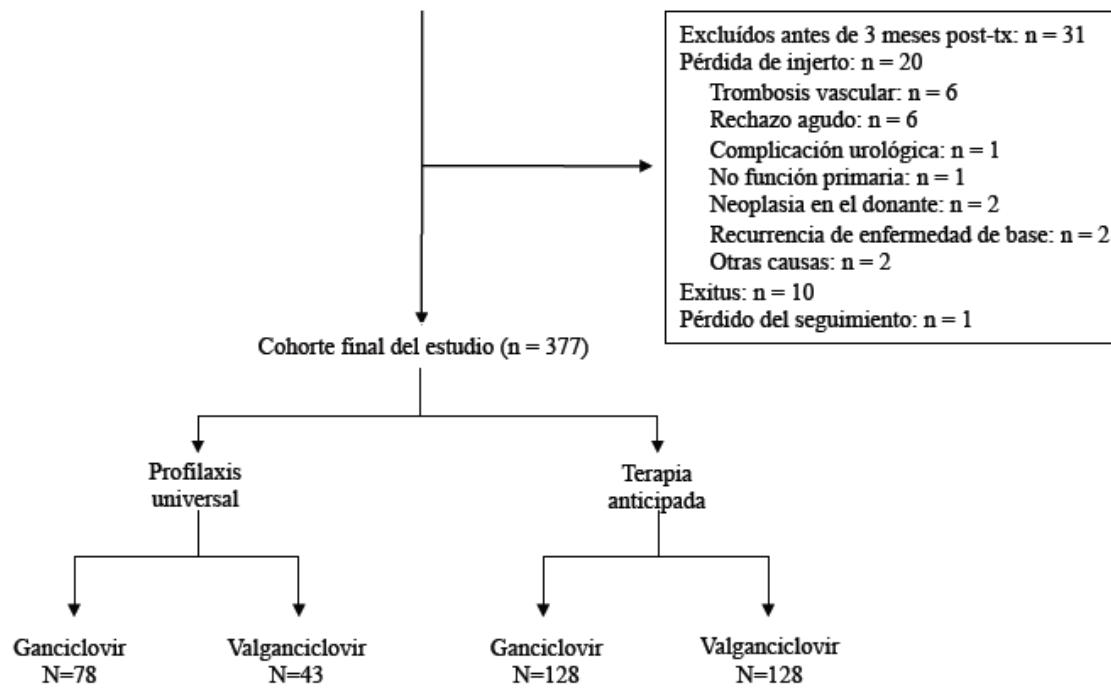
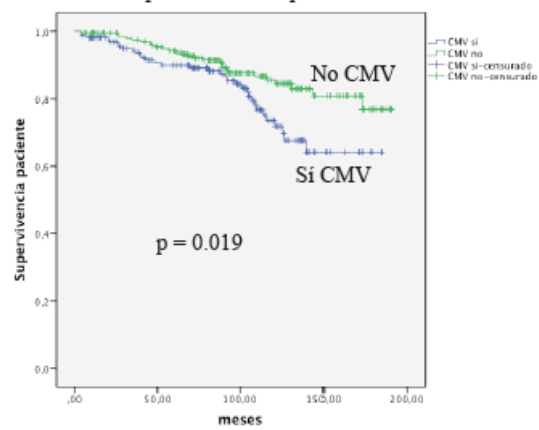


Figura 2 supervivencia del paciente

Click here to download Figura 2 Supervivencia del paciente.pdf



	0	50	100	150	200
Grupo CMV	167	123	77	13	0
Grupo no CMV	210	181	101	35	0

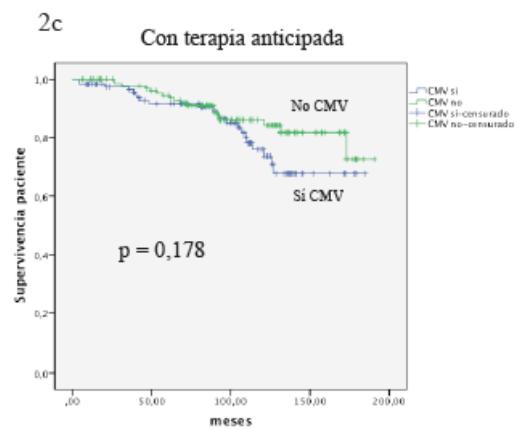
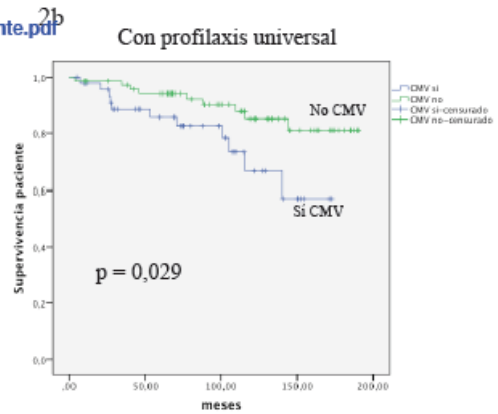
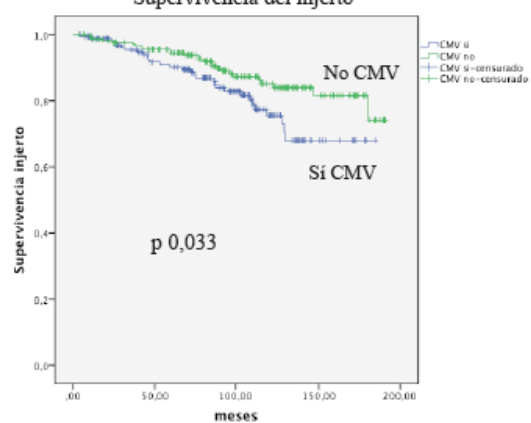
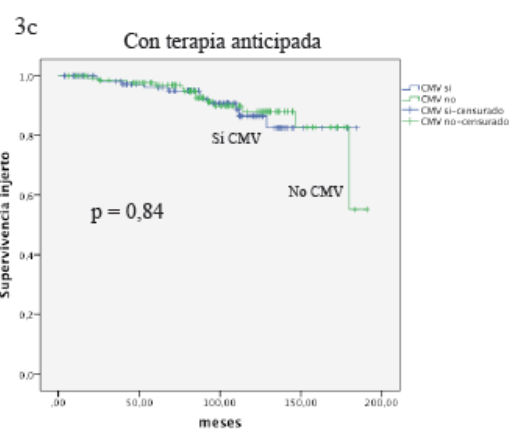
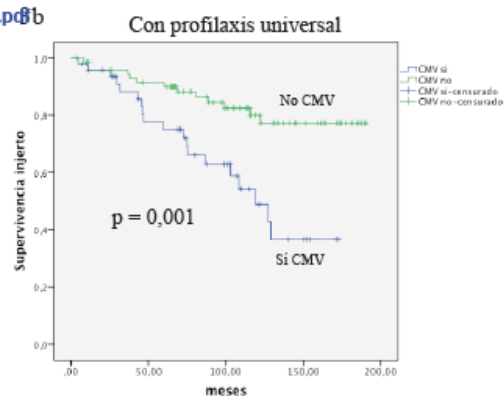


Figura 3 supervivencia del injerto  
Click here to download Figura 3 Supervivencia del injerto.pdf



	0	50	100	150	200
Grupo CMV	167	121	74	13	0
Grupo no CMV	210	180	99	34	0





**Anexo 2: Artículo publicado en Transplantation**

**Pretransplant CD8 T-cell response to IE-1 discriminates seropositive kidney recipients at risk of developing CMV infection posttransplant**



# Pretransplant CD8 T-Cell Response to IE-1 Discriminates Seropositive Kidney Recipients at Risk of Developing CMV Infection Posttransplant

Maria Ovidia López-Oliva,<sup>1</sup> Virginia Martínez,<sup>2</sup> Águeda Buitrago,<sup>2</sup> Carlos Jiménez,<sup>1</sup> Begoña Rivas,<sup>1</sup> Fernando Escuin,<sup>1</sup> María José Santana,<sup>1</sup> Rafael Selgas,<sup>1,2</sup> and Teresa Bellón<sup>2,3</sup>

**Background.** Cytomegalovirus (CMV) infection is an ongoing clinical problem in solid-organ transplantation (SOT). Pretransplant CMV serology is currently the only tool for assessing the risk of CMV infection, although cellular immune responses driven by CMV-specific CD4 and CD8 T lymphocytes are important for controlling viral replication. Therefore, the analysis of CMV-specific T cells may be useful for estimating the risk of infection.

**Methods.** This is a prospective study of patients with kidney transplants and no prophylactic treatment for CMV replication. CD4 and CD8 T-cell responses to the major CMV pp65 and IE-1 antigens in 15 seropositive patients at intermediate risk of CMV infection were investigated, according to current algorithms. Intracellular flow cytometry was employed to determine IFN- $\gamma$  production as a functional readout. The response was analyzed in pretransplant samples and prospectively at 1 and 6 months and at 1 year posttransplant.

**Results.** It was observed that the CD8 responses to IE-1 antigen were practically absent pretransplant in patients who developed CMV infection posttransplant. Within the group of patients free of infection, CD8 responses to IE-1 were detected more frequently and were significantly higher ( $P=0.0083$ ). In a receiver operating characteristics curve analysis (AUC=0.929;  $P=0.010$ ; 95% CI: 0.078–1.0), low CD8 responses to IE-1 ( $\leq 0.05\%$ ) pretransplant predicted the development of CMV infection under the immunosuppressive regime after transplant with 100% specificity and 85.7% sensitivity.

**Conclusions.** Assessment of IE-1-specific CD8 T-cell frequencies pretransplant may be a useful tool for identifying seropositive SOT patients at risk of developing CMV infection posttransplant.

**Keywords:** Cytomegalovirus, Immune monitoring, Cytokine flow cytometry, Kidney transplant, Peptides, T cells, Intracellular flow cytometry, IFN- $\gamma$ .

(*Transplantation* 2014;97: 839–845)

Despite prevention and viral control strategies, cytomegalovirus (CMV) infection in immunocompromised subjects in general is still a health problem (1, 2).

Financial support for this study was provided by Roche Pharma, Caja Castilla-La Mancha, Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo, and grant SAF 2010-19867 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (to TB). The authors declare no conflicts of interest.

<sup>1</sup> Nephrology Service, University Hospital La Paz, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Health Research Institute, University Hospital La Paz—IdiPAZ, Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Address correspondence to: Teresa Bellón, Health Research Institute, University Hospital La Paz—IdiPAZ, Paseo Castellana 261, Madrid, Spain.

E-mail: teresa.bellon@salud.madrid.org

M.L.O., C.J., F.E., R.S., and T.B. participated in designing the research. T.B. designed the experiments and analyzed the experimental data, V.M. and A.B. performed the experiments, M.J.S. and B.R. assisted with the procurement of blood samples, and M.L.O. and T.B. were responsible for drafting the manuscript.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantationjournal.com](http://www.transplantationjournal.com)).

Received 15 July 2013. Revision requested 12 August 2013.

Accepted 17 October 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/14/9708-839

DOI: 10.1097/01.TP.0000438025.96334.eb

Viral strategies are mainly aimed at avoiding cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells, which supports the theory that these two cell populations play a major role in virus clearance (3), as was previously suspected based on clinical studies (4).

The risk of CMV infection in kidney graft recipients is usually determined by donor and recipient pretransplant CMV serology and by immunosuppression regimes. This classifies patients at low, intermediate, and high risk of viral infection and helps establish a prevention strategy.

Measurement of humoral immune responses (CMV serology) as a tool to predict CMV disease is limited to pretransplant assessment. Current prediction algorithms that rely on pretransplant serostatus and posttransplant viral load testing are suboptimal for ascertaining the risk of CMV disease in certain patients. In recent years, it has become evident that CMV-specific T-cell immunity plays a critical role in controlling CMV infection in immunosuppressed patients (5). Therefore, the analysis of CMV-specific T-cell frequencies can reflect the patients' ability to control the virus, predict patients at risk for developing viral replication or CMV disease after prophylactic treatment, and help clinicians define patient-specific prevention strategies (6).

Monitoring CMV-specific cellular immunity may involve assessing CD4 and CD8 T-cell responses because both subsets seem to play a fundamental role in the control of CMV infections (7–11). Protection from CMV following SOT has been shown to correlate with high frequencies of IE-1 but not pp65-specific CD8 T cells (12); however, these data contradict other studies that indicate that CD4 and CD8 pp65-specific T cells are also important for protecting against CMV disease (13–15).

A non-negligible percentage of seropositive kidney receptors considered at low or intermediate risk eventually develop CMV infection. A better understanding of susceptibility factors in these cases may help prevent severe infections.

The authors therefore performed a prospective analysis of CMV-specific immune cell responses in R+ patients with pre-emptive treatment and compared CD4 and CD8 T-cell responses in patients who developed CMV infection or CMV disease, or both, with those of patients who did not develop CMV infection or whose infection resolved spontaneously. T-cell responses to both pp65 and IE-1 CMV antigens were analyzed before transplant and during the first year posttransplant.

## RESULTS

### CMV Infection Outcomes

A total of 82 kidney transplants were performed in Hospital La Paz from April 2010 to November 2011. Eleven were not included in the study for various reasons. Fifty-six patients received universal prophylaxis, and 15 were treated with pre-emptive therapy to prevent CMV disease. The distribution of the patients related to both prevention strategies is shown in Figure S1 (see Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/A910>).

The 15 patients with no universal prophylaxis and at intermediate risk of CMV replication were analyzed. Six had CMV infection and one had CMV disease (viral syndrome) at  $2.7 \pm 0.7$  months on average (range 2–4 months) after transplant. These seven patients were treated with oral valganciclovir (dose adjusted to renal function), and immunosuppression therapy was reduced in five. Viral clearance, defined as two consecutive negative tests for pp65 antigenemia, was achieved on average after 40 days of valganciclovir treatment. No resistance to valganciclovir therapy was detected. One patient had recurrent infection.

The remaining eight patients did not have CMV disease or infection, and in five of these, no CMV replication was detected at any time. However, three showed positive antigenemia with values equal to or less than two positive cells per  $2 \times 10^5$  leukocytes, which were not confirmed in subsequent tests. These patients were therefore considered free of CMV infection.

Table 1 shows the demographic characteristics of recipients and donors based on CMV infection in the first year posttransplant.

Those patients with CMV infection during the first year posttransplant showed decreased graft survival at 30 months (see Figure S2, SDC, <http://links.lww.com/TP/A910>) and increased incidence of comorbidities. Acute rejection episodes appeared in two patients. In one of them, CMV replication preceded the rejection episode, while in the second patient the rejection occurred before CMV reactivation.

### CMV-Specific Cellular Immune Responses

Conflicting data have been reported concerning T-cell involvement in protection against CMV replication. It was therefore decided to analyze the specific response to IE-1 and pp65 CMV antigens in CD4 and CD8 T cells from seropositive kidney transplant recipients with pre-emptive treatment for CMV infection. Serial samples, including pretransplant samples, were analyzed at various time points.

Preliminary experiments in healthy control subjects and on pretransplant samples confirmed that individuals with CMV-negative serology did not show any specific response against IE-1 or pp65. As expected, most seropositive blood donors responded to both antigens. There was a subset of patients who, despite positive serology to CMV, showed no specific response to IE-1. However, positive responses to polyclonal stimulus, such as *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB), were detected (see Figure S3, SDC, <http://links.lww.com/TP/A910>).

To test whether the lack of response was specific for IE-1 and whether cellular immunity was absent for other CMV antigens, the responses to IE-1 and pp65 CMV proteins in pretransplant blood samples from 15 R+ kidney

**TABLE 1.** Recipient and donor characteristics

	Infection/CMV disease n=7	No CMV n=8
<b>Recipients</b>		
Sex N (% male)	3 (42.9)	7 (87.5)
Age (mean $\pm$ SD)	46 $\pm$ 12.8	47.5 $\pm$ 6.9
Pretransplant dialysis modality N (%)		
Hemodialysis	5 (71.4)	6 (75)
PD	1 (14.3)	0
ESRD—no dialysis	1 (14.3)	2 (25)
Months dialysis preTx (median)	6.6	17.9
1st Tx N (%)	7 (100)	8 (100)
IgG CMV preTx (R+) N (%)	7 (100)	8 (100)
<b>Donors</b>		
Sex N (% male)	3 (42.9)	4 (50)
Age (mean $\pm$ SD)	47.1 $\pm$ 13.8	48.4 $\pm$ 9.8
Deceased vs. living N (%)	2 (28.6) vs. 5 (71.4)	3 (37.5) vs. 5 (62.5)
IgG CMV N (%)		
D+	7 (100)	6 (75)
D–	0	2 (25)
<b>Peritransplant data</b>		
Mismatch HLA $\geq$ 3 N (%)	6 (85.7)	7 (87.5)
Induction therapy N (%)		
Anti-lymphocyte Ab (1 single dose)	1 (14.3)	1 (12.5)
Anti-IL2R	5 (71.4)	7 (87.5)
No induction	1 (14.3)	0

PD, peritoneal dialysis; ESRD, end-stage renal disease; Tx, transplantation; preTx, pretransplantation.



transplant recipients at intermediate risk for CMV infection were compared. The patients were followed for 1 year, and CMV-specific responses were further analyzed at 1 month, 6 months, and 1 year posttransplant.

It was found that, in pretransplant samples, CD8 T-cell responses to IE-1 were significantly higher in patients who did not develop CMV infection by the 1-year follow-up posttransplant (Fig. 1A). In patients with positive responses to IE-1, CD8 T-cell responses predominated over CD4 T-cell responses. In line with this observation, no significant differences were found in the CD4 response to IE-1 in pretransplant samples (Fig. 1B), although a trend toward higher responses was found in patients who did not develop infection. There were also no significant differences in pretransplant CD4 and CD8 T-cell responses in patients who developed viral replication (Fig. 1C). In patients free of viral infection, a predominant response to IE-1 was detected pretransplant in the CD8 compartment (Fig. 1D).

Conversely, no significant differences were found when the response to pp65 was analyzed in pretransplant samples in terms of further CMV infection. No predominant response was observed, either in the CD8 or CD4 subpopulation responses to pp65 (see Figure S4, SDC, <http://links.lww.com/TP/A910>).

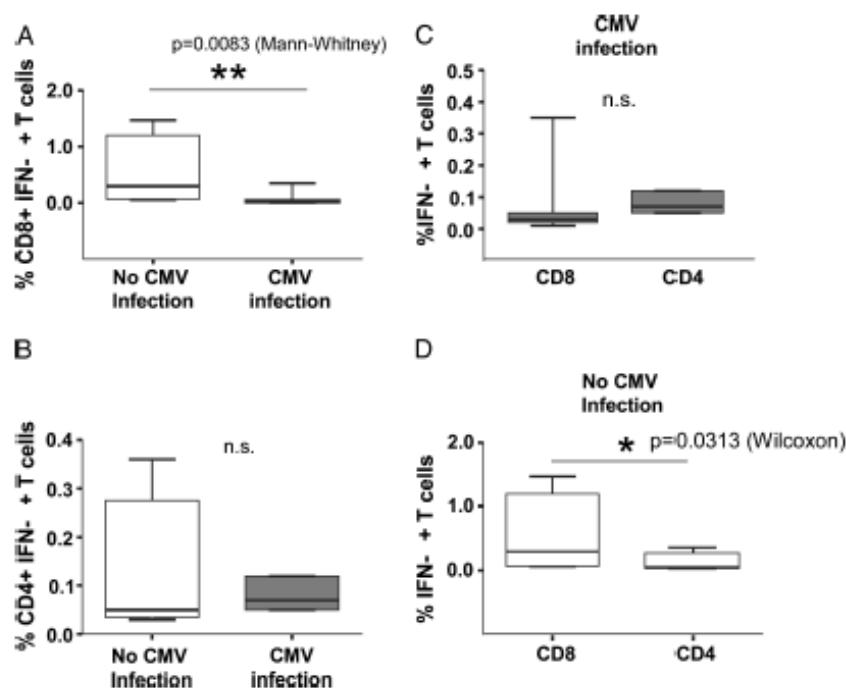
CMV replication occurred in all cases during the first 4 months following kidney transplantation. A longitudinal analysis of CD8 and CD4 responses to IE-1 and pp65

showed that only the CD8 response to IE-1 was different among groups for the first 6-month follow-up (Fig. 2).

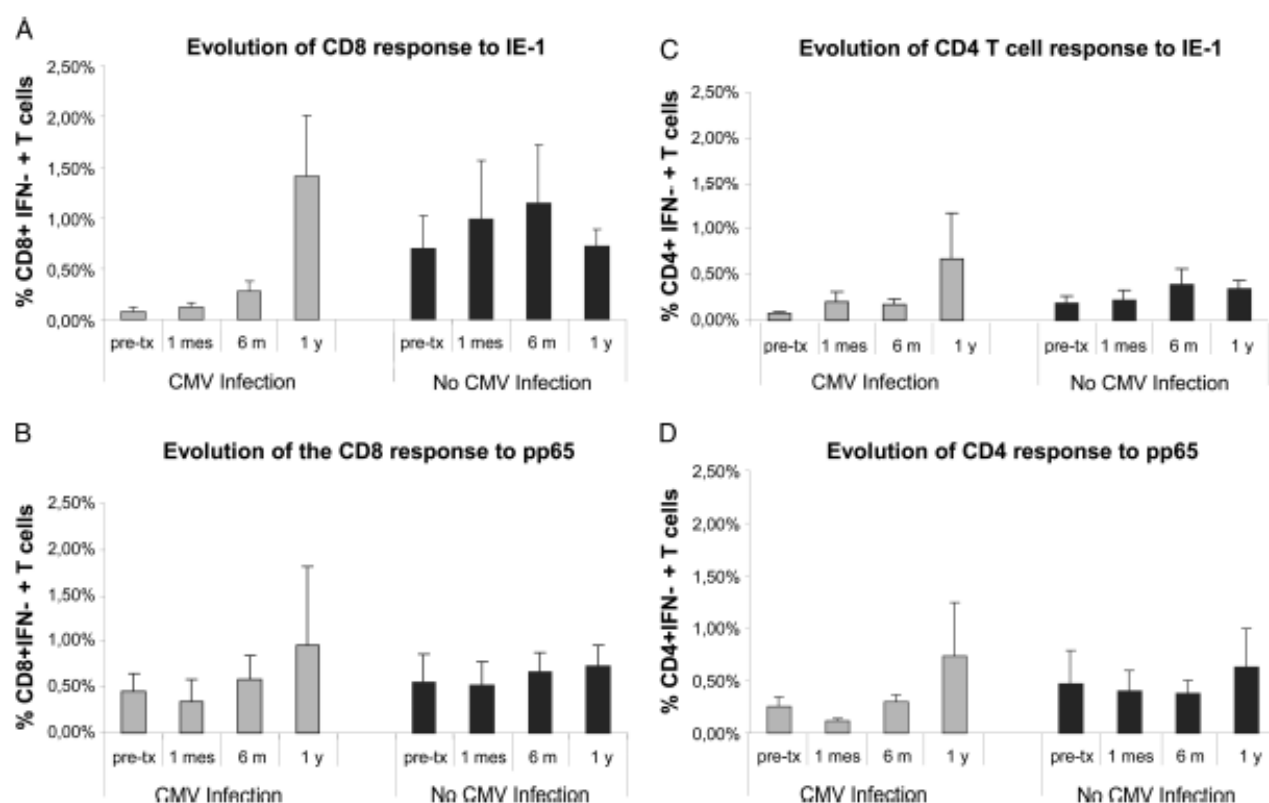
The data suggest that CD8 T-cell response to IE-1 is the relevant parameter for discriminating CMV infection risk among R+ patients with no prophylaxis. This hypothesis was confirmed by a receiver operating characteristics (ROC) analysis of data from pretransplant samples. In this analysis, only CD8 responses to IE-1 pretransplant were significant to predict CMV infection (AUC=0.029  $P=0.010$ ; 95% CI: 0.078–1.0) (Fig. 3). A ROC analysis was also used to identify cut-off levels of CD8 responses to IE-1 below which an increased risk of CMV infection would be indicated. Youden index was calculated and the maximum obtained corresponding to a cut-off of 0.055% of CD8+IFN- $\gamma$ + T cells in response to IE-1, with 100% specificity and 85.7% sensitivity (all patients whose CD8 T-cell response to IE-1 was  $\leq 0.055\%$  developed CMV infection). For values below 0.22%, 85.7% specificity and 50% sensitivity were calculated.

## DISCUSSION

Previous reports suggest that monitoring the immune response to viral antigens is important for maintaining (or withdrawing) prophylactic treatment in transplant patients at risk for CMV disease. Several publications have focused on CD4- and CD8-specific responses to CMV pp65 antigen



**FIGURE 1.** T-cell response to IE-1 antigen in pretransplant samples. PBMCs isolated from patients before transplant were stimulated in vitro with peptide pools spanning IE-1 CMV antigen. The frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD8+ or CD4+ T cells was assessed by flow cytometry in selected CD3+ lymphocytes. A, box plots show the responses (median, 75th and 25th percentiles, and SEM) in CD8 T cells from patients who did or did not develop CMV infection posttransplant. B, responses in CD4 T cells. C, comparison of CD8 and CD4 response to IE-1 in patients with no CMV infection. D, comparison of CD8 and CD4 response to IE-1 in pretransplant samples from patients who developed CMV infection posttransplant. The Mann-Whitney  $U$  test was used to analyze data in panels A and B, and Wilcoxon  $t$  test was applied to data in panels C and D.



**FIGURE 2.** Evolution of IE-1 and pp65 T-cell responses in CMV-seropositive kidney transplant patients with pre-emptive treatment. PBMCs isolated from patients at different time points before or after transplant were stimulated *in vitro* with peptide pools spanning IE-1 or pp65 CMV antigens, and the frequency of IFN- $\gamma$  producing CD8+ or CD4+ T cells was assessed by flow cytometry in selected CD3+ lymphocytes.

(16–18). However, published data suggest that IE-1-specific lymphocytes would be more relevant for preventing CMV reactivation. Previous reports have suggested that monitoring pretransplant CD8 responses could predict future CMV replication in immunocompromised CMV-seropositive individuals (13). However, these studies included patients taking ganciclovir or valganciclovir prophylaxis, and some samples were taken after transplantation.

In this study, CD4 and CD8 T-cell responses to the main CMV T-cell targets pp65 and IE-1 in kidney transplant patients at intermediate risk for CMV infection were analyzed, before and at various times after organ transplantation, using the production of IFN- $\gamma$  in each cell subset, as assessed by intracellular flow cytometry, as a readout.

Despite positive serology in all individuals analyzed pretransplant, approximately 50% had practically negative cellular response to early CMV antigen IE-1. It was found that CD8 responses to IE-1 predominate over CD4 responses, which is similar to that reported in previous publications (19). Accordingly, the main differences between the two patient groups (with or without CMV infection) were found within the CD8 subpopulation, with absence of IE-1-responsive CD8 T cells pretransplant in R+ patients who developed CMV infection upon immunosuppression after kidney transplantation. When the CD8 T-cell response to pp65 was analyzed, there were no significant differences between the two groups.

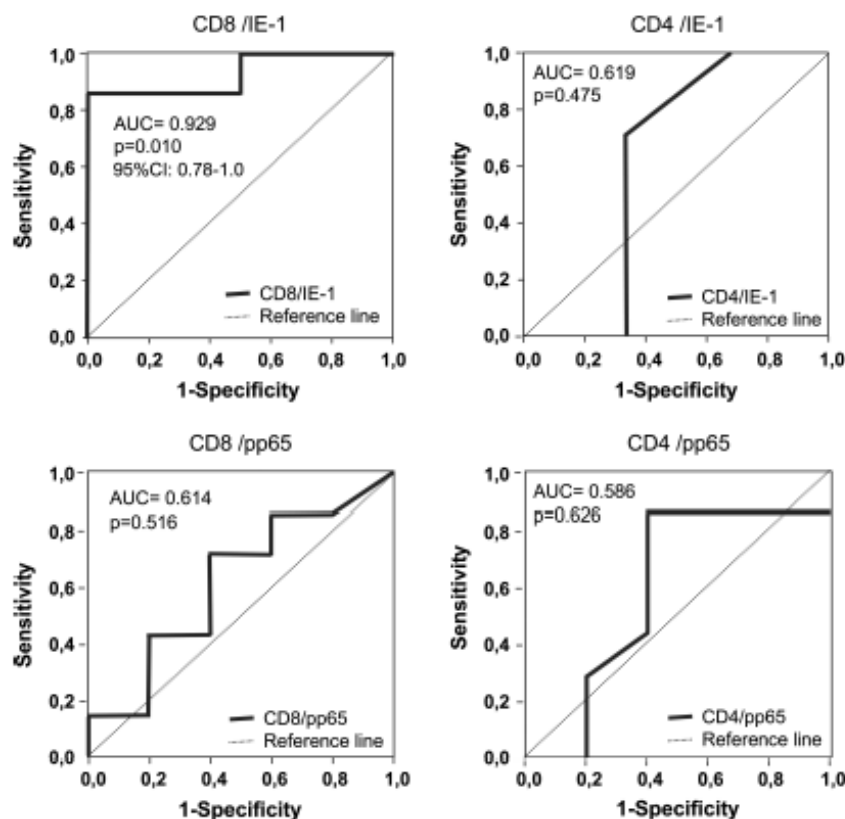
Similar data was reported by Bunde et al. (12) who analyzed the response to IE-1 and pp65 in 23 heart and 4 lung CMV-seropositive transplant recipients. Although they reached similar conclusions, some of the initial determinations were performed during the first days posttransplantation (range 0–4) when patients were already undergoing induction treatment.

Various methods have been used to evaluate CMV-specific cellular immune responses, such as intracellular flow cytometry to evaluate IFN- $\gamma$  production, ELISA, ELISpot, and proliferation assays (6). A recent published study showed that Quantiferon assessment of T-cell responses to several CD8 predominant epitopes could predict CMV disease risk in pretransplant patients (20). However, the analysis included patients at intermediate to high risk of CMV with a low frequency of R+ patients with CMV replication. Moreover, Quantiferon contains a pool of peptides presented by the most frequent HLA-I alleles, and results for this assay may be negative for patients with uncommon HLA types.

This study included 15 CMV-seropositive kidney transplant recipients with no prophylactic treatment. The first sample was obtained pretransplant and before any induction treatment in all cases, which strengthens the conclusion that, in addition to serostatus, IE-1 immunity pretransplant may be useful for risk assessment in SOT recipients.

Patients who developed CMV infection had not developed IE1-specific CD8 T-cell responses after 6 months. This





**FIGURE 3.** Receiver operating characteristic (ROC) analysis of IE-1 and pp65-specific T cells in pretransplant samples from patients who developed or did not develop CMV infection posttransplant. (AUC, area under the curve; CI, confidence interval).

may be a result of the idiosyncratic characteristics of the patients, but it is also possible that valganciclovir (administered to treat the infection) may hamper the development of a proper immune response by inhibiting viral replication. This lack of response was not likely a result of immunosuppression, as average responses to pp65 were similar to those of patients who did not develop CMV infection.

IE-1 is an immediate early antigen expressed at the onset of CMV replication. Conversely, pp65 is expressed in late infectious viral particles. It has been reported that during latency, stochastic episodes of desilencing of the viral genome lead to the expression of IE-1 transcripts, which in mice is accompanied by an activation of effector CD8 T cells specific to a peptide derived from the IE-1 protein. These findings were combined in the silencing/desilencing and immune-sensing hypothesis of virus latency and reactivation. This hypothesis proposes that IE-1 gene expression leads to cell surface presentation of IE-1 and that its recognition by CD8 T cells terminates virus reactivation. This hypothesis has been proven in a murine model of CMV infection (21) and is the basis of a phenomenon called “memory inflation”. A hallmark of CD8 T-cell response to CMV is the observation that with increasing time during latency CD8 T cells specific to certain viral epitopes encoded by “antigenicity-determining transcripts expressed in latency (ADTEs)” increase in numbers (22). It is thus tempting to speculate that patients with

longer exposure to these ADTEs-derived proteins, which would include IE-1 as a major representative, would have a higher frequency of protective IE-1-specific CD8 T cells. An alternative explanation for the scarcity of such lymphocytes in seropositive patients is the availability of HLA-I alleles able to present such antigens to T cells (19, 23).

In conclusion, our results confirm previous data and suggest that CD8 T-cell immunity to IE-1 pretransplant (but not to pp65) protects against CMV replication in immunocompromised patients with no antiviral prophylaxis and at intermediate risk of CMV infection. These results may have implications for the design of clinical strategies for preventing CMV infection, as this assay could be useful for guiding CMV prevention strategies in transplant recipients. However, our study is limited by its single-center nature and the small sample size. Additional studies are needed including more patients and different centers to confirm this hypothesis. Although we have used an antigenemia assay for monitoring CMV infection, these studies could be performed in patients monitored by PCR assessment of DNA copy numbers to estimate CMV viral load because of good correlation between these techniques (24).

Our study's strengths include its prospective nature and sample homogeneity. The use of peptide libraries enables the assessment of responses in every patient, regardless of HLA genotype.

Further research is warranted to study whether the development of CMV infection after prophylaxis in patients at high risk correlates with deficiencies in CD8 T-cell responses to IE-1 and to analyze whether this assay would be appropriate for monitoring immune cell response to maintain or withdraw antiviral treatment in such patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A longitudinal prospective analysis was performed. The study included patients undergoing kidney transplantation at University Hospital La Paz from April 2010 to November 2011 who were at intermediate risk of CMV replication and were undergoing pre-emptive therapy with valganciclovir as a prevention strategy for CMV infection. The patients' CMV antigen responses were assessed. The study was approved by the Institutional Review Board, and all patients gave their written informed consent.

Immunosuppressive treatment consisted of triple therapy with steroids, tacrolimus, and mycophenolate for all patients. The induction treatment is shown in Table 1. Acute rejection episodes were classified according to the Banff working group classification (25), and patients received proper immunosuppressive treatment according to the rejection type.

### Monitoring of CMV Replication

Virological follow-up and diagnosis of CMV replication was conducted by evaluating pp65 antigenemia weekly during the first month, biweekly during the second and third months, and once a month from the fourth month. Positivity was established when at least five positive cells per  $2 \times 10^5$  leukocytes were detected, and pre-emptive treatment with oral valganciclovir was started with a pp65 antigenemia evaluation once a week. Valganciclovir was discontinued after two successive negative tests.

Patients with CMV replication were classified as asymptomatic (infection) or symptomatic (disease) according to the definitions published in the international consensus document for infectious diseases (26).

### Monitoring of CMV-Specific T-Cell Responses

#### Peptides

Pools of overlapping 15-mer ACTS\_human, HCMV-IE-1, and pp65 peptides (ProMix) were purchased from ProImmune (Oxford, UK).

#### Antibodies

CD28, CD49d, CD3-PerCP, CD4-FITC, CD8-APC, and IFN- $\gamma$ -PE antibodies were purchased from Miltenyi Biotec.

### PBMC Preparation and Stimulation for Ex Vivo Analysis of CMV-pp65 and IE-1-Responsive T Cells

Blood samples were collected in EDTA, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll/Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation. In vitro stimulation was performed as previously described (27). Briefly, CMV pp65, IE-1, or control ProMix peptides (1  $\mu$ g/mL) were added to 2 million cryopreserved PBMCs in 0.5 mL RPMI-1640 medium (Lonza) containing 10% heat-inactivated FCS (CM). Costimulatory antibodies to CD28 and CD49d (Miltenyi) were added to the cultures to 1  $\mu$ g/mL each at the same time as peptides. Cells were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in loosely covered Falcon 2025 tubes (BD Biosciences). After 2 hours, 0.5 mL CM containing brefeldin A (BFA; Sigma-Aldrich) was added to the cultures for a final concentration of 2.5  $\mu$ g/mL BFA. The cells were incubated overnight before intracellular flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  production. Parallel cultures were established: a negative control in the presence of a peptide library representing human actin (ACTS-human) and a positive stimulation control with *Staphylococcus enterotoxin B* (Sigma-Aldrich).

### Flow Cytometry Analysis

For intracellular flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  production, cells were stimulated overnight as described above, washed and labeled for 20 minutes

with CD3-PerCP, CD4-FITC, and CD8-APC antibodies before permeabilization (FACS permeabilization solution 2; BD), followed by labeling with IFN- $\gamma$ -PE for 30 minutes. Half of the sample was stained with PE-IgG1 control isotype. Flow analysis was performed in a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with CellQuest Pro Software (BD). At least 100,000 events were collected for each condition.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with SPSS and GraphPad programs. For the description of quantitative variables, the results are expressed as mean $\pm$ SD values or as median and ranges where appropriate. Patient data were compared using the chi-square test for categorical variables and the Mann-Whitney U test and Wilcoxon test for continuous variables, when appropriate. The incidence of kidney graft survival according to CMV replication was calculated using Kaplan-Meier curves and the log rank. The cut-off levels of IFN- $\gamma$ -producing T cells associated with the best specificity and sensitivity were analyzed by means of ROC curve analysis with Youden test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Rosario Madero from the Statistics Department of IdiPAZ for her invaluable help with ROC curve analysis of the data.

The authors would like to thank Juliette Siegfried and her team at ServingMed.com for their editing of the manuscript.

## REFERENCES

- Humar A, Snyderman D. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(Suppl 4): S78.
- Kotton CN. CMV: prevention, diagnosis and therapy. *Am J Transplant* 2013; 13(Suppl 3): 24.
- Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res* 2011; 157: 151.
- Rook AH. Interactions of cytomegalovirus with the human immune system. *Rev Infect Dis* 1988; 10(Suppl 3): S460.
- Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 2004; 65: 500.
- Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 1678.
- Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, et al. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN- $\gamma$ -producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood* 2003; 101: 2686.
- Sester U, Gartner BC, Wilkens H, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1483.
- Gerna G, Lilleri D, Fomara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2356.
- Egli A, Binet I, Binggeli S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med* 2008; 6: 29.
- Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 2463.
- Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1031.
- Crough T, Fazou C, Weiss J, et al. Symptomatic and asymptomatic viral recrudescence in solid-organ transplant recipients and its relationship with the antigen-specific CD8(+) T-cell response. *J Virol* 2007; 81: 11538.
- Lacey SF, La Rosa C, Zhou W, et al. Functional comparison of T cells recognizing cytomegalovirus pp65 and intermediate-early antigen polypeptides in hematopoietic stem-cell transplant and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; 194: 1410.
- Lilleri D, Zelini P, Fomara C, et al. Inconsistent responses of cytomegalovirus-specific T cells to pp65 and IE-1 versus infected dendritic cells in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1997.



16. Christmas SE, Halliday D, Lawton N, et al. Cytomegalovirus-specific CD8+ T cells do not develop in all renal transplant patients at risk of virus infection. *Transpl Immunol* 2009; 22: 99.
17. Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, et al. Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 501.
18. Sinclair E, Black D, Epling CL, et al. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFN $\gamma$  expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. *Viral Immunol* 2004; 17: 445.
19. Khan N, Best D, Bruton R, et al. T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection. *J Immunol* 2007; 178: 4455.
20. Cantisan S, Lara R, Montejo M, et al. Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 738.
21. Simon CO, Holtappels R, Tervo HM, et al. CD8 T cells control cytomegalovirus latency by epitope-specific sensing of transcriptional reactivation. *J Virol* 2006; 80: 10436.
22. Seckert CK, Griessl M, Buttner JK, et al. Viral latency drives 'memory inflation': a unifying hypothesis linking two hallmarks of cytomegalovirus infection. *Med Microbiol Immunol* 2012; 201: 551.
23. Ameres S, Mautner J, Schlott F, et al. Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003383.
24. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1142.
25. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10: 464.
26. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 779.
27. Zhou W, Longmate J, Lacey SF, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009; 113: 6465.

---

## Advertising in *Transplantation*

Please direct all inquiries regarding advertising in *Transplantation* to:

Benjamin Harkinson  
National Account Manager  
Phone: 646-574-0286  
Email: Benjamin.Harkinson@WoltersKluwer.com

---

